

# 生态科学进展

(第四卷)

*Advances in Ecological  
Sciences* (Vol. 4)

段昌群 主编



高等教育出版社  
Higher Education Press



58.18

410

# 生态科学进展

(第四卷)

Advances in Ecological Sciences

(Vol. 4)

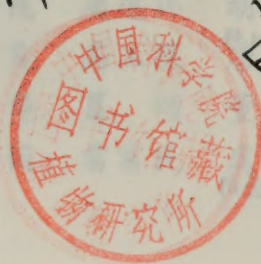
段昌群 主编

吕晓涛先生惠赠

植物所图书馆谨致谢忱

\*\*\*\*\*

赠中科院植物所图书馆  
吕晓涛



高等教育出版社  
HIGHER EDUCATION PRESS

中科院植物所图书馆



S0056468



内 容 提 要

本书从生态学基础理论和应用两个方面遴选了在分子生态与生态基因组学、土壤生态学、群落与生态系统生态学、生态功能与生态管理、生态教育等领域前沿热点问题的专题评述论文 11 篇，旨在介绍国内外生态科学的最新成果、发展动态和研究进展，为从事生态学工作的研究人员、高校教师、研究生和高年级本科生及时了解生态科学发展动态提供资料。

图 书 在 版 编 目 ( C I P ) 数 据

生态科学进展. 第 4 卷 / 段昌群主编. —北京: 高等教育出版社, 2008.9  
ISBN 978 - 7 - 04 - 024842 - 5

I. 生… II. 段… III. 生态学—文集 IV. Q14 - 53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 120870 号

策划编辑	高新景	责任编辑	张雪丽	封面设计	王凌波	责任绘图	尹 莉
版式设计	马敬茹	责任校对	胡晓琪	责任印制	韩 刚		

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-58581118
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100120	网 址	http://www. hep. edu. cn
总 机	010-58581000		http://www. hep. com. cn
经 销	蓝色畅想图书发行有限公司	网上订购	http://www. landraco. com
印 刷	北京民族印刷厂		http://www. landraco. com. cn
		畅想教育	http://www. widedu. com
开 本	787 × 1092 1/16	版 次	2008 年 9 月第 1 版
印 张	11.5	印 次	2008 年 9 月第 1 次印刷
字 数	280 000	定 价	25.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 24842-00



## 《生态科学进展》编委会名单

顾问：吴征镒      张新时      孙儒泳      李文华      蒋有绪  
洪德元      冯宗炜      林 鹏      郑光美      张亚平  
方精云      徐汝梅      宋永昌      钟章成      祝廷成  
姜汉侨      王焕校      骆世明

主 编：段昌群

副主编：(按姓氏笔画为序)

马克平      何大明      张福锁      陈家宽      林金安  
祖元刚      陶 澍      盛连喜      康 乐      彭少麟  
葛剑平      傅伯杰

编 委：(按姓氏笔画为序)

卜文俊      王 刚      王仁卿      王凤友      王根轩      王德利  
龙春林      叶 辉      叶万辉      朱永官      安树青      严重玲  
苏智先      李 博      李庆军      李冰祥      李金刚      杨 良  
杨 劼      杨允菲      杨宇明      杨肖娥      杨君兴      杨树华  
束文圣      张一平      张大勇      张国盛      张金屯      张金池  
陈小勇      陈同斌      陈保善      陈桂珠      岳 明      周 伟  
周 跃      周启星      周浙昆      周道玮      胡海清      钟 扬  
赵之伟      徐丽华      徐宏发      高玉葆      唐 亚      曹 敏  
常 杰      康慕谊      彭 华      葛 颂      董 鸣      董元华  
蒋志刚      蒋国芳      韩兴国      雷富民      虞 泓      熊治廷  
潘晓玲      薛建辉

编辑部：高新景 (高等教育出版社)

于福科      刘嫦娥      Cindy Q. Tang (云南大学)





# 前 言

作为探讨生物与环境相互关系的一门学科,生态学已有百年的历史。蓬勃发展的生命科学在向宏观和微观两极延伸的过程中,生态学不仅成为宏观生命科学领域最主要的学科,还因在微观分子、细胞等水平上交叉渗透,贯通融合了生物学多个分支学科,成为生命科学领域最活跃、最重要的学科之一。生态学不仅在探索生物生存、适应和进化规律中不断取得突破,而且拓展到对人类生存发展及其资源和环境,乃至地球命运的关注。目前还很少有像生态学这样一个学科,沟通自然界、人类社会经济运行,在多维视野和多个空间尺度上连接过去、现在和未来,既成为认识自然规律的重要学科,也成为指导人类社会行为准则的一个知识体系,被公认为支撑可持续发展的核心学科之一。

鉴于生态学的重要地位和作用,生态学研究多年以来热度不减。在国际上,生态学一直是众多高等院校和科研机构优先发展的学科之一。“十一五”以来,我国高校进行重点学科遴选时,全国设立了9个生态学国家级重点学科点,生态学成为设点最多的学科之一;中国科学院在构建国家知识创新体系时,重组、强化和新设立的以生态研究为重要内容的科研机构达20余个。

随着生态学作用和地位被全社会广泛接受和认同,多种层次的教学和研究普遍展开。为此,迫切需要创办一个连续出版物,定期反映和归纳总结国内外生态学领域的前沿动态和热点问题,为我国生态学科学研究、人才培养和学科建设及时提供最新信息,并成为展示我国生态学研究水平和特色的窗口。这一提议,得到广泛响应。高等教育出版社的林金安先生高度关注这个问题,积极推动了这项工作的开展,为本连续出版物搭建了一个很好的出版平台。在老一辈德高望重的生态学大师的指导下,在诸多学界同仁和专家的支持和鼓励下,组织成立了编委会。经过一年多的努力,终于使第一卷书稿问世。此连续出版物的组织编写和出版,得到了云南大学生态学国家级重点学科建设、省部共建云南生物多样性保护与利用国家重点实验室培育基地、国家重点基础研究发展计划项目(2003CB415103)、云南大学环境科学与生态修复研究所的支持。

应该指出的是,生态学任何一个领域的任何一个问题,都可能是一个古老的问题,也可能是一个常讲常新的问题;同一个问题,往往因研究者研究的角度和方法的不同,获得的理解和认识有较大差异;同时生态学研究具有很强的区域性,此地的热点和前沿未必就是彼地的热点和前沿,此地认识透彻了未必就能替代彼地的研究,从而可比性往往较差,有时甚至相互的认同程度不高。好在从不同的角度、不同的层次、不同的区域认识不同或相同的问题,本身就是生态学的重要特色,从而在重点介绍国际生态前沿工作的同时,也注重对我国乃至不同区域生态学研究的综述和评介。如果能做到抛砖引玉,促进学术交流,凸现中国生态学的学术高峰和特色,催生中国生态学的学派发展,本出版物的目的也就达到了。

《生态科学进展》是一个连续出版物,每年一卷。随着它的编辑和出版,更热切期望得到更多生态学前辈和同仁们的关怀和指导,诚恳地希望有更多的老一辈专家和青年学子共同建设这个大家共享的论坛,进入编委会,提供高质量的稿件,为我国生态学的科研和人才培养共同构建一个大家经常想得起、平时用得成的资讯平台。

段昌群

2007年12月18日





# 目 录

## 土壤生态学

- 丛枝菌根真菌影响土壤结构的生态机制研究 ..... 郭 涛 邓 胤 (3)
- 固氮蓝细菌对盐碱土改良的贡献 ..... 张 巍 冯玉杰 (11)
- 土壤反硝化作用及其环境效应研究进展 ..... 续勇波 蔡祖聪 雷宝坤 段昌群 (19)

## 群落及生态系统生态学

- 新疆高盐环境可培养嗜盐放线菌多样性研究 ..... 职晓阳 唐蜀昆 徐丽华 李文均 (49)
- 植物内生放线菌研究进展 ..... 秦 盛 陈华红 李 洁 赵国振 徐丽华 李文均 (59)

## 分子生态与生态基因组学

- 基因表达谱和基因芯片在生态毒理学中的应用与生态毒理基因组学研究进展  
..... 刘立娜 段昌群 (77)
- 植物重金属转运蛋白及其基因的研究进展 ..... 刘声传 段昌群 (93)

## 生态功能与生态管理

- 瑞香狼毒研究综述 ..... 黄新会 于福科 马永清 (115)
- 生态补偿机制与生态系统服务功能评价 ..... 王淑军 刘 建 王仁卿 王玉涛 (127)
- 塔里木河下游应急输水后的生态响应研究进展 ..... 弋良朋 (141)

## 生态教育

- 大学生态学教学及教材建设进展：国内外比较 ..... 段昌群 常学秀 和树庄 (157)

# Contents

## Soil Ecology

- Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Inoculation to Soil Structure under Ecological View  
..... Guo Tao Deng Yin (3)
- Contribution of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria to the Improvement of Saline Soils  
..... Zhang Wei Feng Yu-jie (11)
- Denitrification in Soils and Its Environmental Effects: a Review  
..... Xu Yong-bo Cai Zu-cong Lei Bao-kun Duan Chang-qun (19)

## Population Ecology, Community and Ecosystem Ecology

- A Study on Biodiversity of Halophilic Actinobacteria in Hypersaline Environments  
..... Zhi Xiao-yang Tang Shu-kun Xu Li-hua Li Wen-jun (49)
- Advances in Research of Endophytic Actinomycetes  
..... Qin Sheng Chen Hua-hong Li Jie Zhao Guo-zhen Xu Li-hua Li Wen-jun (59)

## Molecular Ecology and Ecological Genomics

- Advances in Applications of Gene Expression Profiling and Microarrays in Ecotoxicology and Ecotoxicogenomics  
..... Liu Li-na Duan Chang-qun (77)
- Advance in Heavy Metal Transport Proteins and Their Related Genes in Plant  
..... Liu Sheng-chuan Duan Chang-qun (93)

## Ecosystem Services, Ecosystem Management

- Review of Study on *Stellera chamaejasme* L. .... Huang Xin-hui Yu Fu-ke Ma Yong-qing (115)
- Ecological Compensation and Ecosystem Services Function Assessment  
..... Wang Shu-jun Liu Jian Wang Ren-qing Wang Yu-tao (127)
- A Review of the Study of Ecological Responses to Artificial Water-recharge of the Lower Reaches of Tarim River, China ..... Yi Liang-peng (141)

## Ecological Education in Higher Education

- Progress in the Teaching and Textbook Construction in Ecology Program of Universities: Comparative Studies ..... Duan Chang-qun Chang Xue-xiu He Shu-zhuang (157)



# 土壤生态学

---

Soil Ecology





# 丛枝菌根真菌影响土壤结构的生态机制研究

郭涛\* 邓胤

(西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

## Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Inoculation to Soil Structure under Ecological View

Guo Tao\* Deng Yin

(College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**摘 要** 良好的土壤团粒结构是土壤肥力的物质基础, 是作物高产所必需的土壤条件之一, 同时土壤结构对许多地下过程的控制性作用, 在生态系统和全球变化中起着重要的作用。作为土壤中重要的优势种的一类微生物, 丛枝菌根真菌是影响土壤团粒结构形成和稳定的极其重要的因素, 其机制是建立在进入土壤中的碳通量变化及有机质等和碳有关的代谢基础上、在不同的生态学层次进行的。在群落水平上、个体水平上及菌丝水平上都有相应的作用机制, 尤其是菌丝所分泌的球囊霉素相关蛋白已成为目前一个研究热点问题。对丛枝菌根真菌影响土壤结构的生态机制的研究不仅有助于改良土壤结构, 提高土壤质量, 保证我国的粮食安全, 而且有助于进一步阐明丛枝菌根真菌在生态系统中的作用。

**关键词** 土壤结构; 菌根真菌; 菌丝际; 球囊霉素相关蛋白

**Abstract** The soil aggregate structure brings higher soil fertility which meets the need of more crop yield and also controls many underground processes which play an important role in ecosystem and global change. As the dominant species in soil microbiology, arbuscular mycorrhizal fungi is critical factor in soil aggregate formation and stability procedure which is based on the change of carbon flux into soil and the effect operating concurrently in an ecological hierarchical levels: plant community, individual root, and the soil mycelium. Among them the glomalin related protein secreted by hyphae received more and

基金项目: 国家自然科学基金项目“丛枝菌根真菌侵染影响土壤结构作用与机制研究”(40701085), 西南大学科研启动基金(SWUB 2006044)资助。

作者简介: 郭涛, 男, 生于1978年, 博士, 副教授; 主要研究方向为植物营养和农业微生物应用。

\* 通讯作者: guotaosd@swu.edu.cn

more attentions and became hot point in soil structure research. These studies are useful to improve the soil fertility and quality which can meet the need of food safety in our country and may help us elucidate the role of arbuscular mycorrhizal fungi in nature ecology system.

**Key words** soil structure; mycorrhizal fungi; hyphalsphere; glomalin related protein

## 1. 前言

### 1.1 良好的土壤结构是土壤质量的基础

土壤是人类生存和发展的重要自然资源,是重要的环境要素,是农业生产和自然生态系统的基础,是人类社会生存和发展的基础。在中国历史上由于某些因素引起的土壤质量退化而给我国古代文明和社会发展造成惨痛影响的事例时有发生,中华文明中心的迁移便是一次次的明证(Duan *et al.*, 1998)。而在 21 世纪,我国农业又面临着三大问题:人口数量增加、生活质量提高、耕地资源减少。为了满足人们日益增长的物质消费需求,确保食物安全,缓解我国的耕地压力,必须提高整个土地资源的承载能力。为解决人口、粮食、环境三大矛盾,在目前生物育种技术没有明显突破的条件下,提升土壤肥力,藏粮于地,提高耕地质量成为重要解决之路。因此,2007 年中央一号文件中明确提出“切实提高耕地质量”,而土壤良好的结构是土壤能有效发挥其功能的基础,提高土壤质量和生产力自然而然地归结到如何提高土壤中团聚体的数量和质量上来,因它直接决定了耕地土壤接纳和储蓄水分及营养物质的能力和作物产量(彭新华等, 2004)。土壤肥力是土壤的最基本的特征,良好的土壤团粒结构是土壤肥力的物质基础,是作物高产所必需的土壤条件之一。土壤团聚体是土壤的重要组成部分,在土壤中具有“三大作用”,即保证和协调土壤中的水肥气热、影响土壤中酶的种类和活性、维持和稳定土壤疏松熟化层(王清奎和汪思龙, 2005),其大小、形状和稳定性直接影响土壤中水和空气的关系,决定土壤孔隙的分布,并由此影响土壤的许多属性和作物生长。不同粒级的微团聚体在营养元素的保持、供应及转化能力等方面发挥着不同的作用。因此,在土壤科学研究中,土壤结构的研究关注于土壤团粒结构在农业生产中的作用,在这方面积累了大量的资料(Bronick & Lai, 2005)。

### 1.2 土壤结构是土壤生态过程的功能基础

20 世纪 90 年代开始,生态学家们开始认识到土壤结构对许多地下过程的控制性作用(Jastrow & Miller, 1991),在生态系统和全球变化中起着重要的作用。目前,科学家关注全球变化的主要问题是温室气体释放的土壤过程、土壤生物区系和有机质在全球 C 循环中参与的程度(Ingram & Freckman, 1998)。土壤可以通过两种方式实现其影响全球变化的功能:第一,通过与其他圈层间的物质交换,影响土壤全球变化。第二,通过全球土被时空的演变,引起土壤全球变化(赵其国, 1994)。土壤结构是土壤在生态系统和全球变化中发挥其功能的物质基础,即所谓的土壤功能区域(functional domains in soil),是指土壤中的特殊位置,主要包括有机资源(落叶层或土壤有机质)、生物(如无脊椎动物或根)或非生物(如冻融交替或干湿交替)的主要调节者、由调节者创造的一些结构(如粪粒、地道或裂缝)以及生活在这些结构当中独立的小型无脊椎动物和微生物群落(Lavelle, 2000)。这些功能区域可由从土壤基质中自然地分离出来的调节者形成的一些结构(孔隙、团聚体、构造物)中加以识别,也是主要的土壤功能过程在特定时空尺度上起作用的场所。诸如有机质的分解作用等过程可能交替地得到增强或抑制,取决于所考虑的时空尺度(梁文举和闻大中, 2001)。

土壤结构是在矿物颗粒和有机物等土壤成分参与下,在干湿冻融交替等自然物理过程作用下



形成不同尺度大小的多孔单元,具有多级层次性(Díaz *et al.*, 2002),通常用团聚体的稳定性来表征土壤结构(Six *et al.*, 2000a)。土壤团聚体的形成、特性以及作用功能十分复杂,既受土壤本身物质组成的影响,还受人为活动等因素的影响(Bronick & Lai, 2005),土壤团聚体的形成及稳定机制受到生物、物理、化学的作用及它们之间协同作用的影响,微生物既是土壤的重要组成部分,又是形成土壤团聚体最活跃的生物因素,在许多陆地生态系统中,丛枝菌根真菌是重要的一类微生物,大部分条件下是作为优势类群存在的(Smith & Read, 1997),它是影响土壤团聚体形成和稳定的一种极其重要的因素(Rillig & Mummey, 2006)。

丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌是自然界中分布极其广泛、农业和生态意义十分重大的一类土壤真菌,它能与绝大多数的农作物形成稳定的共生关系,构成植物系统的一个重要组成部分(Pennisi, 2004; 张美庆等, 1999),对增强植物抗逆性意义重大(Auge, 2004; 王曙光和林先贵, 2001)。长久以来,人们已经认识到菌根结构具有黏附土壤颗粒的作用,菌根研究者在实验过程中发现被菌根真菌侵染的根系往往黏附更多的土壤颗粒,难于清洗,这便是菌丝所致(Graham *et al.*, 1982),因而在早期菌根研究中运用黏附土壤的重量来估算外延菌丝的长度,从另一个方面说明了菌丝黏附土壤的潜在作用。

## 2. 菌根侵染影响土壤结构的机制

### 2.1 菌根侵染改良土壤结构的作用缘于AM真菌共生特点

众所周知,土壤团聚体的形成,必须依赖于土壤中的有机物质,是土壤团聚体中的重要组分,对团聚体在土壤中的“三大作用”具有重要的影响。而AM真菌是一类专性活体共生微生物,由于自身不能合成糖类物质,菌根真菌必须依赖宿主植物提供的光合产物维持生长(Marschner, 1995),Jennings(1995)认为AM真菌的碳几乎全部来自寄主植物,Jongen等(1996)以三叶草为材料测定了菌丝消耗的植物碳,结果表明植物光合作用的4%~20%用于内生菌根真菌的消耗。Miller等(1995)报道土壤中内生菌根菌丝密度达到 $0.03 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,根据这个数值,Zhu和Miller(2003)估算出外延菌丝对土壤中有有机碳输入的贡献达 $54 \sim 900 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。据估计全球每年有50亿吨的碳被菌根真菌所消耗(Bago *et al.*, 2000),大大增加了土壤中有有机物质的输入。然而,不同AM真菌由于其结构和成分的不同,在土壤中分解的速度也会不同,最终对土壤结构的作用也会有所差异(Treseder *et al.*, 2005),而丛枝菌根真菌影响土壤结构的机制是建立在进入土壤中的碳通量及有机质等和碳有关的代谢基础上的。依照生态学研究范畴的分类,菌根可以在不同生态学层次上影响土壤团聚体(Rillig & Mummey, 2006),在下文的陈述中按照其综述的分类方式,将分别就植物的群落水平、植物个体的根系水平及菌根菌丝本身说明菌根影响土壤结构的作用,在不同层次上菌根的作用机制可能会不同,但需要注意的是在不同层次上的作用不是相互独立的,它们之间存在着内在的关联。

### 2.2 群落水平的作用

作为一类主要的土壤真菌,菌根真菌最突出的作用就是由于宿主植物与其建立共生体系后,所获得的收益不同,进而整个植物群落的组成会受到影响。研究表明,土壤团聚体的形成会受到不同植物种类的作用,因此植物群落组成的改变进而会作用于土壤结构。菌根真菌的多样性是影响植物群落生产力的重要因素。群落的净初级生产力决定了进入到土壤中的碳通量(植物凋落物和用于构建根系的糖类物质),最终影响了土壤团聚体。

AM真菌能改变植物群落的物种组成。Wilson和Hartnett(1997)发现,通过抑制菌根真菌

的感染,不但降低了群落总的地上生物量,也改变了群落中植物的比例。Cavagnaro 等 (2004) 的研究发现,未接种丛枝菌根真菌时,种植在一起的番茄野生体 (76R) 和其突变体 *rmc* (不被菌根真菌侵染) 之间生长差异不显著,而接种后,野生体的生物量显著大于突变体,说明了菌根真菌能够影响植物之间的竞争力,也说明了在自然生态系统条件下,丛枝菌根真菌能够改变群落内的物种组成。而 van der Heijden 等 (1998) 通过实验证实,VA 菌根的多样性是维持植物多样性和生态系统功能的一个主要因子。菌根真菌作为陆生植物最古老的共生者,菌根真菌的类型和数量很可能对植物群落的演替过程有所反映,并且菌根真菌很有可能是这一过程的参与者和推动者,这在 Aikio 等人 (2000) 的研究中得到了验证。地上植被的变化最明显的结果就是植被生产力的变化,植物生产力的提高直接增加了土壤中的团聚体数量 (Bronick & Lai, 2005)。

AM 真菌本身的生长活动还能通过菌根际活动影响其他土壤微生物活性,从而影响土壤团聚结构的形成和稳定过程。AM 真菌在生长过程中会向土壤分泌物质,改变土壤微域环境,刺激土壤细菌、放线菌等微生物的繁殖,造成微生物区系的变化 (Artursson *et al.*, 2005; Rillig *et al.*, 2005),但这种变化所带来的土壤结构变化的研究还十分缺乏。菌根真菌不仅改变了根际淀积物的数量,而且淀积物的成分也有所变化,造成细菌群落成分的改变 (Marschner & Baumann, 2003)。AM 真菌的生长造成土壤孔隙的改变,细菌进行生长代谢的基质、养分、水分和氧气浓度等栖息环境条件的改变,细菌群落和功能的变化等目前还不得而知。大量研究表明微生物群落对土壤团聚体水稳性的影响主要依赖于菌根真菌的作用,然而在这些研究中只关注了微生物群落的被动应答特征,菌根真菌和微生物群落的相互作用应做进一步的研究 (Rillig *et al.*, 2005)。

### 2.3 植物个体的根系水平

Rillig 和 Mummery (2006) 在他的综述中把根系对土壤结构的影响可分为三个方面:①根系的物理穿透作用;②根际淀积作用;③根的降解作用。而丛枝菌根真菌对根系的作用主要是通过作用于植物的生物量,改变根的性状,如改变冠根比等,对上述几个过程产生影响。

根系缠绕和物理穿透作用:研究表明 AM 真菌接种可改变宿主根系的生长发育。AM 菌根共生侵染可导致不同草本和木本植物根系形态变化 (Schellenbaum *et al.*, 1991),AM 形成导致根系发育的变化,菌根化植物以三级侧根为主,而非菌根植物以二级侧根为主 (刘文科, 2004),根系变细,区域土壤变得紧实,土壤颗粒趋向于根系表面,消除了小团聚体形成的空间限制。

根际淀积:植物的根分泌物 (主要是大分子多糖类物质) 能增加大团聚体的稳定性,这主要是根系分泌物所带来的碳源有助于团聚体的形成,根系把更多的颗粒黏附在一起,使团聚体更加稳定。而作为一个巨大的碳库,接种菌根真菌后能显著影响植物根系的分泌 (Jones *et al.*, 2004),除了已经报道的定量变化,根系分泌物的性质也有所变化。根系分泌物为土壤微生物提供了碳源,也有助于团聚体的形成。

根的分解:植株根系死亡后,被土壤中的微生物所分解的产物是土壤有机质的重要来源之一,根系的降解也有助于团聚体的形成。Hodge 等 (2001) 发表在 *Nature* 上的文章发现,丛枝菌根真菌能够分解植物残体并吸收其中的<sup>15</sup>N,供给宿主植物利用,说明了丛枝菌根菌丝具有直接分解有机质的能力,以往的研究低估了菌根真菌在这方面的作用。接种菌根真菌既能改变根系形态,也能改变根系的化学成分,既改变了根系分解的速率又使最终分解产物发生了变化。而在外生菌根的研究中发现,菌丝减缓了凋落物的分解速率,即“Gadgil”效应,这缘于养分和水分的双重作用 (Bending, 2003)。

### 2.4 菌丝水平的作用机制

菌根菌丝直接参与土壤团聚体的形成和稳定过程是 AM 真菌影响土壤结构的一个重要方面。



如图 1 所示,大量研究表明菌丝能够参与团聚体的形成和稳定过程 (Smith & Read, 1997)。菌丝将土壤彼此机械地缠绕在一起而形成团聚体,随着菌丝长度的增加,土壤的团聚性也相应增强 (Tisdall & Oades, 1982)。Jastrow 等人 (1998) 利用 path analysis 分析得出,在影响团聚体稳定性的根系、菌丝、微生物量碳、土壤有机碳等诸多因子中,菌丝具有最重要的直接作用。菌丝的形态特征对土壤团聚体发生的尺度具有重要作用,不同真菌的菌丝直径、壁厚、分支模式和分隔都有所差异,即使是同一种真菌,不同生态型的菌种的外延菌丝的形态差异也很大 (Hart & Reader, 2005),这种菌丝形态上的多样性是否会造成对土壤团聚体结构形成和稳定过程的多样性,目前还不得而知。除了菌丝的缠绕网织作用外,菌丝的代谢周期也是一个重要的影响因素,土壤中 AM 真菌的菌丝的代谢周期一般只有 5~6 天 (Staddon *et al.*, 2003),而某些菌丝可在土壤中存在更长的时间,碳标记试验表明 32 天后“信使”菌丝仍存在于土壤中 (Olsson & Johnson, 2005),植物死亡后这些菌丝继续保存在土壤中,起着稳定土壤团聚体的作用。冯固等 (2001) 试验观察到菌根菌丝对粒径为 2~5 mm 和 1~2 mm 的大团聚体的贡献达 100%,显示了菌根菌丝在土壤大团聚体形成中所起的重要作用。大多数对小团聚体的研究关注于有机质颗粒的研究,忽视了菌根对这一过程的作用 (Six *et al.*, 2002),而菌根菌丝对小团聚体的作用大于其 对大团聚体的作用 (Rillig & Mummey, 2006),依据土壤结构分级理论 (Six *et al.*, 2000b),存在于大团聚体结构内的小团聚体势必会影响大团聚体的形成和稳定,而菌根侵染后是否产生影响,产生怎样的影响,值得进一步的研究。

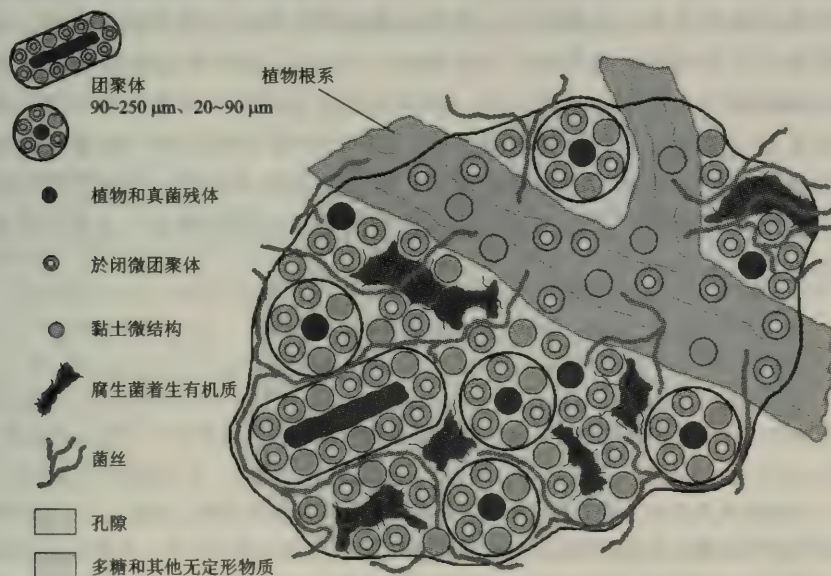


图 1 菌丝对不同尺度土壤团聚体形成和稳定影响示意图 (Rillig & Mummey, 2006)

Fig. 1 Overview of various mechanisms that are hyphal mediated and influence the formation or stabilization of soil at macroaggregate and microaggregate scales

球囊霉素相关蛋白 (GRSP) 作为一种糖蛋白,由于其特殊的生物学特性和理化性质,对土壤团聚体的贡献是非常重要的。1996 年, Wright 与 Upadhyaya 在 121 °C 下用 20 mmol · L<sup>-1</sup> 的柠檬酸钠提取了一种含量丰富、不同寻常的蛋白质,初步认为这种蛋白是由 AM 真菌产生的,进一步的研究发现只有球囊霉属的真菌能分泌此类蛋白,所以将其称为球囊霉素 (glomalin) (Wright & Upadhyaya, 1996),其主要由两部分组成:蛋白质和糖类,并含有丰富的碳,它广泛存在于各种



系列的土壤中,含量达每克土壤中含几毫克 (Wright & Upadhyaya, 1998),并在土壤中相对稳定 (Rillig *et al.*, 2001),且还可促进土壤团聚体的形成。但最近的研究结果显示这种糖蛋白是非特异性的,因此又称为球囊霉素相关蛋白 (glomalin related soil protein, GRSP)。GRSP 由于与增进土壤团聚体的水稳性有关而见著于相关报道 (Wright & Upadhyaya, 1998; Rillig, 2004),但它影响土壤团聚体的作用机制仍不清楚,有人认为球囊霉素是一种水溶性的胶联物质,但缺乏直接的生化证据。最近的研究表明,80%的 GRSP 是吸附在菌丝表面 (Driver *et al.*, 2005),而不是分泌释放到土壤,因而 GRSP 对土壤结构的胶联作用有可能是建立在菌丝结构基础上的。GRSP 在土壤环境中周转速率较慢,<sup>14</sup>C 标记实验表明 GRSP 在土壤中存在可达 6~42 年之久 (Rillig *et al.*, 2001),季节变化幅度小 (Lutgen *et al.*, 2003),与菌丝相比在形成和稳定土壤团聚体方面具有较大的优势。目前还不清楚菌根真菌为什么分泌 GRSP,但已有研究证实 GRSP 的分泌受真菌本身生理状况的控制 (Driver *et al.*, 2005),最近的研究表明,分泌 GRSP 主要源于丛枝菌根真菌自身某些生理作用的原因,而对土壤团聚体的稳定作用是其次生作用 (Sonia & Rillig, 2007),运用分子生物学技术对 GRSP 的功能基因进行定性和量化研究有助于阐明其功能。

### 3. 小结与展望

迄今为止,国内外关于菌根侵染影响土壤结构的研究还较少 (Rillig & Mummey, 2006),对这个问题的研究不仅有助于改良土壤结构,提高土壤质量,保证我国的粮食安全,而且有助于进一步阐明 AM 真菌在生态系统中的作用。自从 Frank (1885) 首次提出菌根概念以来,菌根和菌根真菌的研究已经经历了一个多世纪的时间。早期的研究主要集中于菌根的生理、菌根真菌的纯培养特征及菌根真菌在养分吸收上的作用等方面。20 世纪 80 年代以来,随着先进科技手段的应用以及研究者对生态系统结构和功能理解的深入,菌根真菌的研究进入飞速发展的阶段,菌根对土壤结构作用机制的研究有助于认识生态系统稳定性的维持机制等问题,在更大尺度上理解菌根真菌在全球物质循环中的作用。

### 参考文献

- 冯固, 张玉凤, 李晓林. 丛枝菌根真菌的外生菌丝对土壤水稳性团聚体形成的影响 [J]. 水土保持学报, 2001, 15: 99-102.
- 梁文举, 闻大中. 土壤生物及其对土壤生态学发展的影响 [J]. 应用生态学报, 2001, 12: 137-140.
- 刘文科. 丛枝菌根真菌的土壤生态适应性及其功能差异研究 [M]. 博士学位论文. 中国农业大学, 2004.
- 彭新华, 张斌, 赵其国. 土壤有机碳库与土壤结构稳定性关系的研究进展 [J]. 土壤学报, 2004, 41 (4): 618-622.
- 王清奎, 汪思龙. 土壤团聚体形成与稳定机制及影响因素 [J]. 土壤通报, 2005, 36 (3): 415-421.
- 王曙光, 林先贵. 丛枝菌根 (AM) 与植物的抗逆性 [J]. 生态学杂志, 2001, 20 (3): 27-30.
- 张美庆, 王幼珊, 邢礼军. 环境因子和 AM 真菌分布的关系 [J]. 菌物系统, 1999, 18 (1): 25-29.
- 赵其国. 土壤圈及其在全球变化中的作用 [J]. 土壤, 1994, 26 (1): 4-7.
- AIKIO S, VARE H, STROMMER R. Soil microbial activity and biomass in the primary succession of dryheat forest [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32: 1091-1100.
- ARTURSSON V, FINLAY R D, JANSSON J K. Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal-restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae*

- inoculation or plant species [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7: 1952-1966.
- AUGE R M. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations [J]. *Canadian Journal of Soil Science*, 2004, 84 (4): 373-381.
- BAGO B, PFEFFER P E, YAIR S H. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 949-957.
- BENDING G D. Litter decomposition, ectomycorrhizal roots and the 'Gadgil' effect [J]. *New Phytologist*, 2003, 158: 228-229.
- BRONICK C J, LAI R. Soil structure and management: a review [J]. *Geoderma*, 2005, 124: 3-22.
- CAVAGNARO T R, SMITH F A, SMITH S. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and a mycorrhiza-defective mutant tomato: does a noninfective fungus alter the ability of an infective fungus to colonise the roots—and vice versa? [J]. *New Phytologist*, 2004, 164: 485-491.
- DIÁZ-ZORITA M, PERFECT E, GROVE J H. Disruptive methods for assessing soil structure [J]. *Soil and Tillage Research*, 2002, 64: 3-22.
- DRIVER J D, HOLBEN W E, RILLIG M C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37: 101-106.
- DUAN C Q, GAN X C, WANG J, CHIEN P K. Human factors influencing the environment and the relocation of civilization centers in ancient China [J]. *AMBIO: Journal of Human Environment*, 1998, 27: 572-576.
- GRAHAM J H, LINDERMAN R G, MENGE. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of Troyer citrange [J]. *New Phytologist*, 1982, 91: 183-189.
- HART M M, READER R J. The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies [J]. *Pedobiologia*, 2005, 49: 269-279.
- HODGE A, CAMPBELL C, FITTER A H. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquisition nitrogen directly from organic material. *Nature*, 2001, 413: 297-299.
- INGRAM J, FRECKMAN D W. Soil biota and global change preface [J]. *Global Change Biology*, 1998, 4: 699-701.
- JASTROW J D, MILLER R M. Methods for assessing the effects of biota on soil structure [J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1991, 34: 279-303.
- JASTROW J D, MILLER R M, LUSSENHOP J. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregates stabilization in restored prairie [J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1998, 30 (7): 905-916.
- JENNINGS D H. *The Physiology of Fungal Nutrition* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- JONES D L, HODGE A, KUZUYAKOV Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition [J]. *New Phytologist*, 2004, 163: 459-480.
- JONGEN M P, FAY H, JONES M B. Effects of elevated carbon dioxide and arbuscular mycorrhizal infection on *Trifolium repens* [J]. *New Phytologist*, 1996, 132: 413-423.
- LAVELLE P. Ecological challenges for soil science [J]. *Soil Science*, 2000, 165: 73-86.
- LUTGEN E R, MUIR-CLAIRMONT D, GRAHAM J, RILLIG M C. Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland [J]. *Plant Soil*, 2003, 257: 71-83.
- MARSCHNER H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. (2nd edition) [M]. San Diego: Academic Press, 1995.
- MARSCHNER P, BAUMANN K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize [J]. *Plant and Soil*, 2003, 251: 279-289.
- MILLER R M, MILLER S P, JASTROW J D, RIVETTA C B. External hyphal production of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tall grass prairie communities [J]. *Oecologia*, 1995, 103: 17-23.
- OLSSON P A, JOHNSON N C. Tracking carbon from the atmosphere to the rhizosphere [J]. *Ecology Letters*, 2005, 8: 1264-1270.
- PENNISI E. The secret life of fungi [J]. *Science*, 2004, 304 (11): 1620.



- RILLIG M, MUMMERY D. Mycorrhizas and soil structure [J]. *New Phytologist*, 2006, 171: 41-53.
- RILLIG M C. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes [J]. *Ecology Letters*, 2004, 7: 740-754.
- RILLIG M C, LUTGEN E R, RAMSEY P W, KLIRONOMOS J N, GANNON J E. Microbiota accompanying different arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation [J]. *Pedobiologia*, 2005, 49: 251-259.
- RILLIG M C, WRIGHT S F, NICHOLS K A, SCHMIDT W F, TORN M S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils [J]. *Plant Soil*, 2001, 233: 167-177.
- SCHELLENBAUM L, BERTA G, RAVOLANIRINA F, TISSERENT B, GIANINAZZI S, FITTER A H. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Annals of Botany*, 1991, 68: 135-141.
- SIX J, FELLER C, DENEK K, OGLE S M, de MORAES J C, ALBRECHT A. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils—Effects of no-tillage [J]. *Agronomie*, 2002, 22: 755-775.
- SIX J, PAUSTAIN K, ELLIOT E T. Soil structure and organic matter: I. Distribution of aggregate size classes and aggregate associated carbon [J]. *Soil Science Society American Journal*, 2000a, 64: 681-689.
- SIX J, PAUSTAIN K, ELLIOT E T. Soil structure and soil organic matter: II. A normalized stability index and the effect of mineralogy [J]. *Soil Science Society American Journal*, 2000b, 64: 1042-1049.
- SMITH S E, READ D J. *Mycorrhizal Symbiosis* [M]. London: Academic Press, 1997.
- SONIA P, RILLIG M C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function [J]. *Pedobiologia*, 2007, 51: 123-130.
- STADDON P L, RAMSEY C B, OSTLE N, INESON P, FITTER A H. Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of  $^{14}\text{C}$  [J]. *Science*, 2003, 300: 1138-1140.
- TISDALL J M, OADES J M. Organic matter and water-stable aggregates in soils [J]. *Journal of Soil Science*, 1982, 33: 141-163.
- TRESEDER K K, ALLEN M F, RUESS R W, PREGITZER K S, HENDRICK R L. Lifespans of fungal rhizomorphs under nitrogen fertilization in a pinyon-juniper woodland [J]. *Plant and Soil*, 2005, 270: 249-255.
- van der HEIJDEN M. G, KLIRONOMOS J N, URSIC M, MOUTOGLIS P, STREITWOLFNGEL R, BOLLER T, WIEMKEN A, SANDERS I R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity [J]. *Nature*, 1998, 396: 69-72.
- WILSON G W T, HARTNETT C. Effects of mycorrhizae on plant growth and dynamics in experimental tall grass prairie microcosms [J]. *American Journal of Botany*, 1997, 84: 478-482.
- WRIGHT S F, UPADHYAYA A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Soil Science*, 1996, 161: 575-586.
- WRIGHT S F, UPADHYAYA A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Plant and Soil*, 1998, 198: 97-107.
- ZHU Y G, MILLER R M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8: 407-409.



# 固氮蓝细菌对盐碱土改良的贡献

张巍 冯玉杰\*

(哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090)

## Contribution of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria to the Improvement of Saline Soils

Zhang Wei Feng Yu-jie \*

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**摘要** 土壤盐渍化可以导致土壤某些理化性质发生强烈的变化, 结果造成了不利于大多数作物生长的环境条件。在大多数条件下, 采用常规灌溉和作物管理措施, 土壤中过量的盐分不会随着时间的推移而降低。然而, 在作物生长过程中同时应用固氮蓝细菌看来是一个理想的方法。大多数与细胞结合的  $\text{Na}^+$  保留在蓝细菌细胞外的黏多糖壳内。由于蓝细菌死亡或衰退之后  $\text{Na}^+$  又释放到土壤中, 因此, 采用蓝细菌从盐性土壤中永久除去  $\text{Na}^+$  是不可能的, 但是它可以补充土壤中作物对氮素的需求。本文综述了固氮蓝细菌的结构和功能、耐盐机理以及蓝细菌改良盐碱土的研究进展。

**关键词** 固氮蓝细菌; 盐碱土; 耐盐性

**Abstract** Soil salinization can bring drastic changes in some of the soil's physical and chemical properties resulting in an environment unsuitable for growth of most crops. Excessive salt concentrations in soils, in most cases, cannot be reduced with time by routine irrigation and crop management practices. However, amelioration of soil salinity by simultaneous application of nitrogen-fixing cyanobacteria during crop growth seems to be an attractive approach. Most of the cell-bound  $\text{Na}^+$  remained extracellularly in the mucopolysaccharide sheath of cyanobacteria. Therefore, permanent removal of  $\text{Na}^+$  from saline soils using cyanobacteria may not be possible, since  $\text{Na}^+$  is released back into the soil subsequent to the death

and decay of cyanobacteria, especially since it can also supplement the nitrogen requirement of the crop. This paper represents a trial of effects of shed lights on the structure and function of nitrogen-fixing cyanobacteria, mechanisms of salt tolerance and advance in research on reclamation of saline soils by cyanobacteria.

**Key words** nitrogen-fixing cyanobacteria; saline soils; salt-tolerance

## 1. Introduction

Soil salinization is an important agricultural problem and high NaCl content is a major hindrance to plant growth in saline soils (Boyer, 1972). Apart from the natural causes of salinization like sea-water, inefficient water management practices also result in the secondary salinization of farm-lands (Flowers *et al.*, 1977). Sodium ( $\text{Na}^+$ ) is the predominant deterrent of plant growth in a saline environment. Most crop plants exhibit considerable hypersensitivity to saline environments because (a) intracellular accumulation of  $\text{Na}^+$  is toxic to the cellular metabolism, and (b) osmotic component of salinity stress causes water loss and inhibits growth (Serrano and Gaxiola, 1994). Breeding plants resistant to salinity stress is, therefore, a thrust area of contemporary research (Bohnert and Jensen, 1996). Various means used to ameliorate saline soils include (a) irrigation (Qadir and Oster, 2004); (b) application of amendments like gypsum, pyrites and farmyard manure (Milap *et al.*, 1977); (c) growing salt-tolerant plants like rice, grass (Kumar and Abrol, 1984; Dagar *et al.*, 2004) or sugar beet (*Beta vulgaris* L.).

Conventionally, it is done by addition of gypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) followed by leaching out of excess salts by flooding. An alternate approach, the isolation of active bacteria from saline soils, will allow the use of these bacteria in the reclamation of saline soils. The  $\text{N}_2$ -fixing bacteria isolated from saline soils (Zahran *et al.*, 1995) could be good candidates for improving the fertility of reclaimed saline soils. A biological approach to the problem of saline soils using cyanobacteria (blue-green algae) was proposed in the early 1950's, wherein natural populations of nitrogenfixing cyanobacteria (blue-green algae) were employed for reclamation of saline/alkaline "usar" lands typical of certain North Indian states (Singh, 1950, 1961). It was claimed that cyanobacteria absorbed and permanently immobilized  $\text{Na}^+$  intracellularly, resulting in the decrease of soil salinity. The possibility of simultaneously augmenting the carbon and nitrogen status of saline soils was suggested to be an additional attraction of such a reclamation strategy (Singh, 1961). The present study was undertaken (a) to explore if nitrogen-fixing cyanobacteria could also be used to improve coastal saline soils, and (b) to elucidate the basis of modification of soil salinity subsequent to cyanobacterial growth. The results show that the cyanobacterial application can reduce salinity of moderately saline coastal soils and that such amelioration of soil salinity is consequent to a possible entrapment of  $\text{Na}^+$  in their extracellular mucopolysaccharide sheaths. Using nitrogen-fixing cyanobacteria for reclamation of saline soils (Singh, 1961) has been attempted with some success. However, the mechanism of amelioration of soil salinity by cyanobacteria has not been adequately understood, so this review aims mainly at presenting a comprehensive understanding of the mechanisms of amelioration of saline soils by nitrogen-fixing cyanobacteria.



## 2. Structure and function of nitrogen-fixing cyanobacteria

Cyanobacteria (blue-green algae) are photosynthetic prokaryotic microorganisms capable of fixing atmospheric  $N_2$  using sunlight as the sole energy source (Stewart, 1980; Vega-Jarquin *et al.*, 2003). They can be found in a wide range of diverse environments characterized by extremes of temperature, desiccation, pH, salinity, light intensity, and nutrients (Ben-Porath and Zehr., 1994). Upland soils in arid climates are very inhospitable to many microorganisms because of high temperatures and limited water, yet cyanobacteria are especially resistant to such adverse conditions and thus form the dominant component of the microflora in many cases.

The  $N_2$ -fixing cyanobacteria known so far have been classified into three groups: unicellular, filamentous nonheterocystous, and filamentous heterocystous. The entire group of  $N_2$ -fixing cyanobacteria (including the heterocystous and nonheterocystous filamentous/unicellular forms) is able to use molecular nitrogen as a nitrogen source (see Fig. 1). Fogg (1949) demonstrated experimentally that heterocysts are the specialized cells that contain the nitrogen-fixing mechanism. Considerable studies were carried out on heterocystous forms, and it was proved by immunolabeling studies that heterocysts are the location of the enzyme nitrogenase (Flemming and Haselkorn, 1973).

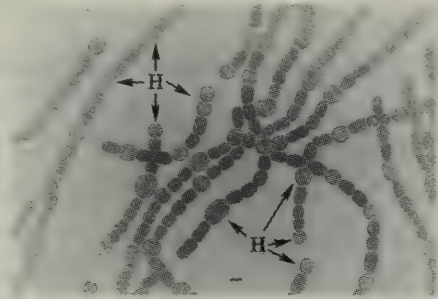


Fig. 1 The structure of nitrogen-fixing cyanophytes (H-heterocyst)

图1 固氮蓝藻的结构 (H为异形胞)

## 3. Mechanisms of cyanobacterial salt tolerance

Mechanisms underlying salinity in cyanobacteria consist of at least three phenomena: (a) exclusion of  $Na^+$ ; (b) osmoregulation during salt adaptation of cyanobacteria; (c) cyanobacterial salt tolerance can be modified by environmental factors, especially combined nitrogen.

### 3.1 Exclusion of $Na^+$

Cyanobacteria require trace quantities of sodium for growth, photosynthesis and nitrogen fixation (Apte and Thomas, 1980, 1983, 1984). Many cyanobacteria are also moderately salt tolerant. However, unlike halophytes (Apte and Thomas, 1986; Reed *et al.*, 1985), curtailment of  $Na^+$  influx plays a useful role in cyanobacterial halotolerance. It may contribute to salt tolerance significantly by reducing the need (a) to pump out excess  $Na^+$ , accumulated during salt stress, at a considerable energy cost and (b) to tune the metabolism to function at higher intracellular salt concentrations.



The features of  $\text{Na}^+$  transport across the membrane have a great relationship with cyanobacterial halotolerance.  $\text{Na}^+$  exclusion is an active process driven by a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport system (Apte and Thomas, 1986). The cell membranes of many bacteria possess  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters. In cyanobacteria the inwardly directed proton-motive force ( $-\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ), created by respiratory proton extrusion, is coupled to the creation of an inwardly directed sodium-motive force ( $-\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ ). Bacteria which grow at high pH maintain a cytosol which is relatively acidic (Blumwald *et al.*, 1984; Padan *et al.*, 1981). The proton concentration gradient across the membrane ( $\Delta\text{pH}$ ) therefore diminishes  $-\Delta\mu_{\text{H}^+}$ , which then might not be strong enough to create any useful  $-\Delta\mu_{\text{Na}^+}$  via the antiporter.

Cyanobacteria possess antiporters that expel  $\text{Na}^+$  and admit  $\text{H}^+$  at high pH, which means that both ions are transported against their concentration gradients. This can occur because the antiporter is electrogenic; more than one proton is admitted per  $\text{Na}^+$  extruded (Krulwich and Guffanti, 1989) and the exchange is therefore driven by the electrical potential across the membrane ( $\Delta\Psi$ ) rather than by ( $-\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ). The electrogenic antiporter thereby allows the bacterium to simultaneously acidify its cytosol and build a ( $-\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ ) to power  $\text{Na}^+$ -coupled transport processes. The necessary  $\text{H}^+$  gradient is generated by a proton translocating ATPase located in the plasmalemma.  $\text{Na}^+$  exclusion achieved primarily by curtailment of net  $\text{Na}^+$  uptake, which appears to be an important mechanism of combating salt stress in cyanobacteria.

### 3.2 Osmoregulation in cyanobacteria

Osmoregulation in cyanobacteria grown at high external NaCl concentrations involves the accumulation of internal osmoticum in the form of inorganic ions (Miller *et al.*, 1976) such as  $\text{K}^+$  or organic osmolytes such as sugars, polyols, EPS (exopolysaccharides) (see Fig. 2) and quaternary amines (Blumwald, 1983). The very rapid NaCl entry into the cell triggers the adaptive response of cyanobacteria. Subsequently, the cells slowly pump out  $\text{Na}^+$  via a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. It appears that osmotic shock increases the permeability to NaCl. Moreover, it is very likely that osmotic shock inhibits the sodium pump and the ATPase that power it. Therefore, after osmotic shock, the permeability of plasmalemma to NaCl would be anticipated to be too great for the sodium pump to overcome, resulting in a net uptake of NaCl. Following the shock, the membrane recovers and becomes less permeable to NaCl.

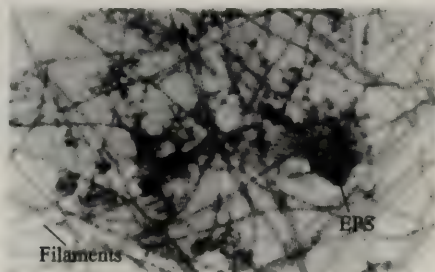


Fig. 2 Localization of EPS from cyanobacteria by the toluidine blue technique.

图 2 通过甲苯胺蓝技术确定蓝藻中的 EPS

### 3.3 Enhancement of salt tolerance by combined nitrogen

Inhibition of  $\text{Na}^+$  influx by combined nitrogen is a major mechanism for protection of cyanobacteria against salt stress, which has been proved. The ability to curtail  $\text{Na}^+$  influx can be induced by the pres-

ence of combined nitrogen in the form of nitrate or ammonium in the growth milieu, both nitrate and ammonium appear to interact with the  $\text{Na}^+$  carrier and inhibit  $\text{Na}^+$  influx competitively.

During exposure to salt stress, cyanobacteria do not accumulate  $\text{Na}^+$  and show a high energy demand for an obligatory extrusion of this cation. The presence of combined nitrogen facilitates maintenance of low intracellular concentrations of  $\text{Na}^+$ . This mechanism can also be exploited to prevent the accumulation of excess  $\text{Na}^+$  during salt stress in saline and alkaline soils.

#### 4. Reclamation of saline soils by cyanobacteria

The abundant growth of cyanobacteria in the appropriate period is beneficial to saline soils. A significant reduction in pH, electrical conductivity, exchangeable sodium, hydrolic conductivity, and aggregation status of the soil, as well as a significant increase in the total N content of the soil concomitant with cyanobacterial growth, were noted by Subhashini and Kaushik (1981). They can benefit plants by producing growth-promoting substances, and by increasing the availability of P by excretion of organic acids (Choudhury and Kennedy, 2004).

The most important alga are species of *Nostoc* (*N. commune*, *N. muscorum*, *N. punctiforme*), *Scytonema* (*S. ocellatum*, *S. javanicum*), *Microcoleus* (*M. chthonoplastes*, *M. vaginatus*), *Porphyrosiphon* (*P. notarisii*), *Camptylonema* (*C. lahorensis*), and *Cylindrospermum* (*C. licheniforme*, *C. muscicola*). The larger population of  $\text{N}_2$ -fixing cyanobacteria comprises the filamentous and heterocystous forms. *Nostoc commune* has been found to be the most important source of N biologically fixed in saline soils. Wetland rice fields can provide an ideal condition for the growth of cyanobacteria, which accumulate  $19 \sim 28 \text{ kg N} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{crop}$ , and can reduce the use of urea fertilizer for a rice crop in saline soils by 25% ~ 35% (Hashem, 2001).

Ever since the importance of cyanobacteria was recognized, a considerable amount of research has been carried out to evolve methods and means to effectively utilize these organisms as a biofertilizer (Shi *et al.*, 1987, 1991). One of the biotechnological applications that resulted from the development of a cyanobacterial biofertilizer program (Patterson, 1996) has been the extension work, or the preparation and distribution of biofertilizers to farmers. For improving the laboratory culture of cyanobacteria, the use of polybag bottles, instead of expensive glass flasks, has been suggested (Sathiyamoorthy and Shanmugasundaram, 1992). The method of distribution of liquid cyanobacterial cultures in polyethylene and polypropylene sachets has also been developed (Suresh *et al.*, 1992). In such a case, the direct application of cyanobacteria to the field may be considered. A systematic compilation of the practically possible and less-expensive methods of large-scale  $\text{N}_2$ -fixing cyanobacterial production has been provided by Venkataraman (1993). Two of these methods-through or tank and two-field and nursery-cum-algal are for bulk production of the  $\text{N}_2$ -fixing cyanobacteria on a commercial scale (Venkataraman, 1993).

#### 5. Concluding remarks

Cyanobacteria play a major role in improving the soil environment in addition to N fixation. They have the capacity to reclaim saline soils. Furthermore, concurrent with  $\text{N}_2$  fixation, the cyanobacteria



synthesize and excrete a variety of organic/growth-promoting substances, simultaneously augmenting the carbon and nitrogen status of saline soils, which is an additional attraction of such a reclamation strategy.

Cyanobacteria can curtail  $\text{Na}^+$  intracellularly, resulting in the decrease of soil salinity, which can help explain the relative abundance of cyanobacteria on saline and alkaline soils. It has been further shown that the ability to curtail  $\text{Na}^+$  influx can also be enhanced by certain environmental factors such as osmoregulation or combined nitrogen. Cyanobacteria growth on saline soils is consistent with their inherent ability to tolerant salinity.

A variety of free-living cyanobacteria are now identified as efficient components of cyanobacterial biofertilizers. The production of nitrogen-fixing cyanobacterial biofertilizer in relatively simple tubular reactors may be a much more attractive way to utilize these agriculturally beneficial organisms. Thus, any practice aimed at increasing biological nitrogen fixation through cyanobacterial biofertilization can be acceptable to a large spectrum of farmers.

## Acknowledgments

A portion of the work was supported by School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology. We thank Freshwater Algae of Culture Collection of Chinese Academy of Sciences for providing cyanobacteria for us.

## References

- APTE S K, THOMAS J. Sodium is required for nitrogenase activity in cyanobacteria [J]. *Current Microbiology*, 1980, 3: 291-293.
- APTE S K, THOMAS J. Impairment of photosynthesis by sodium deficiency and its relationship to nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena torulosa* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1983, 16: 153-157.
- APTE S K, THOMAS J. Effect of sodium on nitrogen fixation in *Anabaena torulosa* and *Plectonema boryanum* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130: 1161-1168.
- APTE S K, THOMAS J. Membrane electrogenesis and sodium transport in filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria [J]. *European Journal Biochemistry*, 1986, 154: 395-401.
- BEN-PORATH J, ZEHR J. Detection and characterization of cyanobacterial *nifH* genes [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1994, 60: 880-887.
- BLUMWALD E, PACKER L. Studies of osmoregulation in salt adaptation of cyanobacteria with ESR spin-probe techniques [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1983, 80: 2599-2602.
- BLUMWALD E, WOLOSIN J M, PACKER L.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in the cyanobacterium *Synechococcus* 6311 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, 122: 452-459.
- BOHNERT H J, JENSEN R G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants [J]. *Trends in Biotechnology*, 1996, 14: 89-97.
- BOYER J S. Plant productivity and environment [J]. *Science*, 1972, 218, 443-448.
- CHOUDHURY A T M A, KENNEDY I R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production [J]. *Biological Fertility Soils*, 2004, 39: 219-227.
- DAGAR J C, TOMAR O S, KUMAR Y, et al. Growing three aromatic grasses in different alkali soils in semi-arid regions of northern India [J]. *Land Degradation and Development*, 2004, 15: 143-151.

- FLEMMING H, HASELKORN. Differentiation in *Nostoc muscorum*: Nitrogenase is synthesized in heterocysts [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1973, 70: 2727-2731.
- FLOWERS T J, TROKE P F, YEO A R. The mechanism of salt tolerance in halophytes [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1977, 28: 89-121.
- FOGG, G E. Growth a heterocyst production in *Anabaena cylindrical* Lemm. II. In relation to carbon and nitrogen metabolism [J]. Annals of Botany, 1949, 13: 241-259.
- HASHEM M A. Problems and prospects of cyanobacterial biofertilizer for rice cultivation [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2001, 28: 881-888.
- KRULWICH T A, GUFFANTI A A. Alkalophilic bacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 1989, 43: 435-463.
- KUMAR, ABROL I P. Studies on the reclaiming effect of Karnal grass and Para grass grown in a highly sodic soil [J]. Indian Journal of Agricultural Sciences, 1984, 54 (3): 189-193.
- MILAP C, ABROL I P, BHUMBLA D R. A comparison of eight amendments on soil properties and crop growth in a highly sodic soil [J]. Indian Journal of Agricultural Sciences 1977, 47 (3): 348-354.
- MILLER D M, JONES J H, YOPP J H, et al. Ion metabolism in a halophilic blue-green alga *Aphanothece halophytica* [J]. Archives of Microbiology, 1976, 138: 333-337.
- PADAN E, ZIBERSTEIN D, SCHULDINER S. pH homeostasis in bacteria [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1981, 650: 151-166.
- PATTERSON, G M L. Biotechnological applications of cyanobacteria [J]. Journal of Science Industrial Research, 1996, 55: 669-684.
- QADIR M, OSTER J D. Crop and irrigation management strategies for saline-sodic soils and waters aimed at environmentally sustainable agriculture [J]. Science of the Total Environment, 2004, 323: 1-19.
- REED R H, RICHARDSON D L, WARR S R C, et al. Na<sup>+</sup> uptake and extrusion in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714 in response to hypersaline treatment. Evidence for a transient changes in the plasmalemma Na<sup>+</sup> permeability [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1985, 814: 347-355.
- SATHIYAMOORTHY P S, SHANMUGASUNDARAM S. Polybag bottle: A culture system for cyanobacteria. P. 39 in Abstr. 32d Annual Conf. Agric. Microbiol., Madurai Kamraj Univ., Madurai, India, 1992.
- SERRANO R, GAXIOLA R. Microbial models and salt stress tolerance in plants [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1994, 13: 121-138.
- SHI D J, BROUERS M, HALL D O, et al. The effects of immobilization on the biochemical, physiological and morphological features of *Anabaena azollae* [J]. Planta, 1987, 172: 298-308.
- SHI D J, XU W Y, ZHAO X F. The effects of immobilization on photosynthesis, growth, nitrogen fixation and ammonium ion excretion of mutant and wild type cells of an *Anabaena variabilis* [J]. Acta Botanica Sinica, 1991, 33: 335-342.
- SINGH R N. Reclamation of 'Usar' lands in India through blue-green algae [J]. Nature, 1950, 165: 325-326.
- SINGH R N. Reclamation of 'Usar' lands in role of blue green algae in nitrogen economy of Indian agriculture [J]. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1961, 83-98.
- STEWART W D P. Some aspects of structure and function of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 1980, 34: 497-536.
- SURESH G, GOPINATH T N, KATHIRESAN D, et al. Growth of cyanobacteria in sachet packs. P. 39 in Abstr. 32d Annual Conf. Agric. Microbiol., Madurai Kamraj Univ., Madurai, India, 1992.
- SUBHASHINI D, KAUSHIK B D. Amelioration of sodic soils with blue-green algae [J]. Australian Journal of Soil Research, 1981, 19: 361-366.
- STEWART W D P. Some aspects of structure and function in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 1980, 34: 497-536.



- VEGA-JARQUIN C, GARCIA-MENDOZA M, JABLONOWSKI N, et al. Rapid immobilization of applied nitrogen in saline-alkaline soils [J]. *Plant and Soil*, 2003, 256: 379-388.
- VENKATARAMAN G S. Blue-green algae (cyanobacteria) in biological nitrogen fixation [J]. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1993, 45-76.
- ZAHARAN H H, AHMAD M S, AFKAR E A. Isolation and characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic bacteria from saline soils of Egypt [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1995, 35: 269-275.

# 土壤反硝化作用及其环境效应研究进展

续勇波<sup>1,2,5\*</sup> 蔡祖聪<sup>2</sup> 雷宝坤<sup>3,4</sup> 段昌群<sup>1</sup>

(1 云南大学生命科学学院暨云南生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地, 昆明 650091; 2 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008; 3 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094; 4 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205; 5 云南农业大学, 昆明 650201)

## Denitrification in Soils and Its Environmental Effects: a Review

Xu Yong-bo<sup>1,2,5\*</sup> Cai Zu-cong<sup>2</sup> Lei Bao-kun<sup>3,4</sup> Duan Chang-qun<sup>1</sup>

(1 Laboratory of Conservation and Utilization of Bio-Resource & School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3 College of Resources and Environment, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 4 Institute of Agricultural Environment and Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 5 Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**摘 要** 土壤反硝化作用是土壤氮素由活性氮向惰性氮转化的唯一途径, 是实现完整氮素循环、平衡全球氮输入通量的重要环节和机制, 对维持生态系统平衡具有重要作用。然而伴随着反硝化过程, 土壤和肥料氮素的损失, 温室气体  $N_2O$  的排放等多重负面生态环境效应会产生, 因此, 反硝化过程已经成为国内外土壤学家和环境学家研究的热点领域之一。本文综述了国内外关于土壤反硝化作用及其环境效应方面的研究成果, 以期积极利用现有研究成果并准确把握其研究方向提供有价值的科学资料。文章首先介绍了土壤反硝化的基本概念、分类、影响因素及反硝化作用的定量研究方法, 在此基础上探讨了土壤反硝化作用的环境效应, 包括反硝化造成农业生态系统中土壤氮素损失; 产生温室气体  $N_2O$ ; 影响温室气体  $CH_4$  的排放; 以及影响铁元素循环等。文章最后提出了在国内开展土壤反硝化研究中的科学问题和研究展望。

**关键词** 反硝化; 氮损失; 温室气体;  $N_2O$ ;  $CH_4$ ; Fe; 环境效应

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 40471065), 中科院知识创新工程项目 (No. CXTD-Z2005-4), 校青年基金项目 (No. 2007Q001A) 资助。

\* 通讯作者: ybxu@ynu.edu.cn



**Abstract** Denitrification in soils is the only pathway by which active nitrogen is converted into inert nitrogen. It is the indispensable tache for completing the full nitrogen recycle, and the important mechanism for counter-balancing the global input of nitrogen and sustaining the ecological balance. However, denitrification has some negative environmental effects such as nitrogen loss from soils or fertilizers and greenhouse gas  $N_2O$  production. This paper reviews briefly the researches on denitrification in soils and its environmental effects, which would provide some references for applying present accomplishments and mastering the future development of denitrification. The basic conception, sorts, and influencing factors of denitrification in soils, quantitative method for studying denitrification are introduced firstly. Then, environmental effects of denitrification are discussed, including soil nitrogen loss from agricultural ecosystem, production of greenhouse gas  $N_2O$  and influence on  $CH_4$  emission and Fe recycle. Finally, new scientific problems and the development of the field are prospected.

**Key words** denitrification; nitrogen loss; greenhouse gases;  $N_2O$ ;  $CH_4$ ; Fe; environmental effects

## 1. 引言

尽管大气含氮量高达 78%, 但是作物生产在很大程度上仍受限于土壤有效氮的供应, 氮肥的投入是增加作物产量的重要因素。到 2000 年全球氮肥施用量已经超过 100Tg, 目前我国氮肥的生产、进口和施用总量均居世界前列。据中国农业统计年鉴统计 (中国农业年鉴编辑委员会, 2006), 至 2005 年, 我国氮肥施用量已高达 2229.7 万吨, 占化肥总用量的 50% 左右。如此巨大的氮肥投入必将导致更多的氮素损失以平衡全球氮素的输入通量。氮肥利用率低正成为我国农业生产中一个日益突出的问题, 近年来的研究资料表明, 我国主要农作物的氮肥利用率平均只有 35% 左右。氮肥利用率不高, 进一步加剧了氮素的直接损失。此外, 每年由于人类活动造成的陆地固氮量约占总固氮量的 60% (Vitousek *et al.*, 1997), 如此之高的氮输入造成森林生态系统氮饱和和和水生生态系统的富营养化, 加速了生物多样性的丧失 (Vitousek *et al.*, 1997)。

土壤反硝化作用是氮素生物地球化学循环的重要环节。反硝化作用是使含 N 氧化物最终以  $N_2$  形态离开土壤、水体等内部生物循环回到大气的主要过程, 这是平衡生物固氮输入通量的主要途径和机制 (Murray and Knowles, 2003), 是实现完整氮素循环不可缺少的重要一环。从生态学意义讲, 反硝化过程可以被看做是防止系统失衡的一种自平衡机制。从环境保护的角度考虑, 反硝化通过移除水体中  $NO_3^- - N$  或其他氮氧化物对调节水体质量同样具有重要作用。

然而, 反硝化作用也是氮素损失最重要的途径之一, 全球总输入氮量中有 52% ~ 100% 通过反硝化作用进入再循环 (Aulakh *et al.*, 1992), 而氮肥的反硝化损失则在 0 ~ 100 kg N · hm<sup>-2</sup> 之间 (Aulakh, 1985), 约占施入氮肥量的 12% ~ 30% (Hauck, 1981)。由于反硝化极大的时空变异性, 全球氮素反硝化年损失量约为 83 Tg · a<sup>-1</sup> (Stevenson, 1982) 到 390 Tg · a<sup>-1</sup> (Hauck and Tanji, 1982)。

反硝化也是产生温室气体  $N_2O$  的主要途径之一, 土壤硝化反硝化过程释放的  $N_2O$  是全球  $N_2O$  的主要来源, 约占生物圈释放到大气中  $N_2O$  总量的 90%。估计每年全球土壤排放的  $N_2O$  为  $9.5 \pm 4.5$  Tg N, 约占全部排放量的 65%。全球自然陆地生态系统和农业生态系统  $N_2O$  的排放量分别是  $9.7 \sim 12.0$  Tg N · a<sup>-1</sup> 和  $2.3 \sim 3.7$  Tg N · a<sup>-1</sup> (Bouwman, 1990)。  $N_2O$  是重要的温室气体, 大气中  $N_2O$  浓度正以每年 0.25% 的速率上升 (Bouwman, 1990)。目前空气中  $N_2O$  产生的温室效应约相当于人类活动带来温室效应的 5% (Watson *et al.*, 1992)。每分子  $N_2O$  使全球变暖的潜力

大约是每分子  $\text{CO}_2$  的 296 倍 (Robertson, 1993), 它在大气中可存留 120 年, 它的温室效应对于全球气候变化有着重要影响。此外,  $\text{N}_2\text{O}$  还参与大气中许多光化学反应, 破坏大气  $\text{O}_3$  层 (Delgado and Mosier, 1996), 从而增加紫外线到地球表面的辐射量, 对地球生命产生多方面的伤害。

反硝化具有平衡氮通量, 导致土壤和肥料氮素损失, 以及产生温室气体  $\text{N}_2\text{O}$  等氮氧化物污染环境等多重意义, 因此, 反硝化过程已经成为国内外土壤学家和环境学家研究的热点领域之一。如何在维持正常生态平衡的基础上减少氮损失和温室气体排放, 对于环境健康维护、社会经济发展至关重要, 这些方面的研究也引起了越来越多的科学家、政府乃至普通人的关注。对反硝化的深入认识有助于我们量化氮素周转, 预测农田生态系统氮肥去向 (Robertson *et al.*, 2000), 制定污水处理措施 (Schroeder, 1981), 以及评价反硝化过程产生的气态氮氧化物对全球变化和臭氧层破坏的贡献等 (Robertson *et al.*, 2000)。现将国内外关于土壤反硝化作用及其环境效应方面的研究成果综述如下, 以期为进一步深入研究反硝化作用及探讨反硝化对生态环境的影响提供有价值的科学资料。

## 2. 土壤反硝化作用概述

### 2.1 概念

土壤反硝化作用既包括生物反硝化过程, 也包括化学反硝化过程。其中生物反硝化过程最为重要。该过程是指微生物在无氧或者微量氧供应条件下的硝酸盐呼吸过程, 反硝化微生物将  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  或者  $\text{N}_2\text{O}$  作为呼吸过程的末端电子受体, 并将其还原为  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  或者是  $\text{N}_2$ 。而化学反硝化过程则为非生物还原剂所催化, 但该过程似乎只在酸性土壤、冻土、海底沉积物、土壤深层中才有意义 (Sørensen and Thorling, 1991)。通常所说的土壤反硝化作用主要是指土壤生物反硝化过程。反硝化的基本过程是:



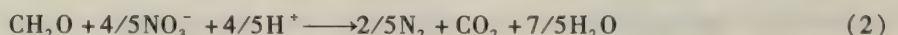
反硝化作用发生的总的要求是: ①存在具有代谢能力的反硝化微生物; ②合适的电子供体; ③厌氧条件或  $\text{O}_2$  的有效性受到限制; ④N 的氧化物, 如  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}$  或者  $\text{N}_2\text{O}$  作为末端电子受体。只有上述条件同时满足时, 反硝化才能进行。反硝化通常在厌氧条件下发生, 但在微厌氧条件下也能发生好气反硝化, 即异养硝化细菌利用  $\text{NH}_4^+$  氧化而来的  $\text{NO}_2^-$  作为电子受体, 将其还原为  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  的过程 (Joo *et al.*, 2006), 某些情况下可成为  $\text{N}_2\text{O}$  或  $\text{N}_2$  的主要产生途径。

### 2.2 土壤反硝化作用的分类

土壤反硝化作用分为生物反硝化和化学反硝化作用。生物反硝化中根据微生物的能量来源(碳源)分为异养反硝化和自养反硝化 (Pauwels, 1994)。异养反硝化微生物的能量来源为有机质, 而自养反硝化的微生物能量来源为无机化合物, 如  $\text{S}^{2-}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$  (van de Graff *et al.*, 1995)。化学反硝化指不需要微生物参与而通过化学反应实现的  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  还原过程。

#### 2.2.1 异养反硝化

异养反硝化是由异养细菌利用有机质的氧化提供的电子还原  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ , 同时产生  $\text{CO}_2$ , 反应方程如下:



其中  $\text{CH}_2\text{O}$  是有机质的简化形式, 根据该公式  $0.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的有机 C 可以还原  $0.03 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NO}_3^-$ 。

#### 2.2.2 自养反硝化



反硝化微生物除从有机 C 氧化获得电子外, 也能从还原态无机物氧化获得电子同化  $\text{CO}_2$  获得碳源, 如硅酸铁、硫化物、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{CH}_4$ 、 $\text{H}_2$  等 (Klüber and Conrad, 1998; Straub *et al.*, 1996), 称为自养反硝化。影响自养反硝化的因素很多, 如土壤电荷表面性质、结晶程度、电子供体浓度、某些金属元素 (由黄铁矿氧化而来或由有机肥带入) 等均有可能对微生物活性产生抑制或促进作用 (Pauwels *et al.*, 2000)。Cu 和 Pb 可作为自养反硝化的催化剂, 催化  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  的氧化还原反应 (Ottley *et al.*, 1997)。

### 2.2.3 化学反硝化

如金属铁可催化以  $\text{H}_2$  为电子供体的反硝化过程 (Huang *et al.*, 1998), 金属铁也可将  $\text{NO}_3^-$  还原为  $\text{N}_2\text{O}$  等 (Sørensen and Thorling, 1991), 这些反应是不需要微生物参与的化学反硝化过程之一。

## 3. 影响土壤反硝化作用的因素

凡是影响到土壤微生物生存与活动的因素均会影响土壤反硝化作用, 而这些因素本身之间也有错综复杂的关系。下面分别对各因素进行分析, 然后进行一个初步的比较与判断。

### 3.1 通气与水分状况

反硝化作用是一个在厌氧条件下进行的微生物学过程, 因而受到土壤水分和通气状况的制约。在旱地土壤中存在的局部或暂时性的厌氧微域环境是引起反硝化作用的条件, 施有机肥因消耗了局部土壤中的氧而促进反硝化。在田间条件下, 灌水、降雨以及土壤本身的机械组成都会影响旱地土壤的水分状况和通气状况, 从而影响反硝化作用。

Aulakh 等 (1992) 认为土壤水分通过以下四个方面直接或间接地影响反硝化作用: ①提供微生物生长或活动的有利条件; ②占据土壤孔隙, 限制氧的供应; ③通过干湿交替, 促进有效碳或氮源的释放; ④为土壤微生物提供转运代谢产物或原料所需的扩散介质。

过去的许多研究均表明土壤中空气与水分的平衡是影响土壤好氧或厌氧微生物活动的重要因素, 对土壤硝态氮的形成与损失均有重要影响。实验室研究表明, 当土壤水分含量低于 60% 最大持水量时, 无论  $\text{NO}_3^-$  供应状况如何, 反硝化作用均是微不足道的 (Aulakh *et al.*, 1991)。在田间研究中, Rolston 等 (1982) 用乙炔抑制方法测定了不同灌水条件下旱地土壤中的反硝化损失, 反硝化作用产生的  $(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2) - \text{N}$  气体量随每周灌水次数的增多而增加。灌溉的这种影响受到土壤类型的制约。在砂土上灌水 2 cm, 在灌后的 3~5 小时内反硝化速率达到最大值, 在 12 小时后则又恢复到灌前水平, 而在壤土上灌溉后 12 小时反硝化速率才达到最大值, 至 48 小时后才恢复到灌前水平, 壤土中的反硝化损失量是砂土中的 2 倍 (Ryden, 1983)。Weier 等 (1993) 研究了土壤孔隙含水量 (WFPS) 对反硝化的影响, 结果表明, 当 WFPS 数值从 60% 增加到 90% 时, 沙土和壤土的反硝化速率分别增加了 6 倍和 14 倍。Aulakh 和 Rennie (1985) 发现, 当 WFPS 在 65%~75%, 反硝化速率很低, 但随含水量的增加呈显著增加趋势。Doran 等 (1990) 研究发现 18 种不同理化性状的土壤反硝化作用的临界值为 70%~80%。

Aulakh 和 Rennie (1985) 田间研究发现, 与反硝化损失显著相关的因素是土壤体积含水量 (或 WFPS), 其次是温度, 而后是土壤硝态氮。在评估综合因素的影响时, 水分与温度的联合效应与反硝化作用呈高度相关, 而加入土壤硝态氮或铵态氮后并没有提高相关系数。这些结果表明, 在他们研究的田间土壤中或者是土壤硝态氮源没有限制反硝化作用, 或者是其他因素如 WFPS 和温度是限制反硝化作用更为重要的因素。

### 3.2 温度

反硝化作用可以在较宽的温度范围内进行。反硝化作用所需温度可以低至  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Dorland and Beauchamp, 1991) 到  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Malhi *et al.*, 1990), 而要明显的反硝化作用往往需要  $>5\text{ }^{\circ}\text{C}$  的条件 (Vinther, 1990)。最佳温度是在  $30\sim 67\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Malhi *et al.*, 1990)。当温度  $>50\text{ }^{\circ}\text{C}$  时化学反硝化作用将起主要作用 (Keeney *et al.*, 1979)。在  $75\sim 85\text{ }^{\circ}\text{C}$  时反硝化作用停止 (Keeney *et al.*, 1979)。

Aulakh 等 (1984) 在田间研究时发现作物生长期间当温度在  $10\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, 温度对反硝化作用的影响很小。不过在早春或晚秋, 当温度降至  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  或者更低时, 事实上就测不到反硝化作用, 即使在土壤湿润、硝酸盐浓度较高时也是如此。

### 3.3 碳源

绝大多数反硝化细菌是异养的, 土壤有机质为参与这一过程的微生物提供了能源。同时有机物质本身是一种电子供体, 而且还是一种呼吸基质, 可引起氧胁迫。因此, 土壤有机质含量越高, 反硝化作用潜力越大 (Drury *et al.*, 1991)。这种关系许多研究者不仅在机理模型 (Grundmann and Rolston, 1987) 中有所描述, 而且在实验室及田间试验中均得到证实 (Drury *et al.*, 1991; Iqbal, 1992; Xu and Cai, 2007)。有些研究者认为土壤反硝化作用的空间变异性部分是有机碳的差异所致 (Fujikawa and Hendry, 1991)。

土壤反硝化势还与有机碳的形态有关, 水溶性碳或易矿化碳与反硝化活性的关系更为密切 (Reddy *et al.*, 1982; Xu and Cai, 2007)。Bijay-Singh 等 (1988) 研究发现, 农田或草地土壤风干后, 反硝化势与水溶性碳及好气培养下的矿化态碳量高度相关; 而土样保持田间湿度时, 反硝化势则与厌氧培养下的矿化态碳量密切相关。他们认为, 在田间条件下, 反硝化作用通常受到厌氧易矿化态碳量的限制。

生物量碳与反硝化势高度相关, 在非风干土壤中尤其如此 (Myrold and Tiedje, 1986)。据 Bijay-Singh 等推测 (1988), 厌氧下的可矿化态碳事实上极有可能与好气条件下的生物量碳是同一组分。

由于绝大多数反硝化细菌是异养型的, 因此碳源的特性及有效性是影响反硝化作用的重要因素。在过去的一些纯培养、混合培养等研究中, 许多化合物如葡萄糖、蔗糖、甲酸盐、柠檬酸盐等都被用作过碳源, 结果发现, 它们可以很有效地促进反硝化作用 (Beauchamp *et al.*, 1989)。当然田间条件下, 植物残茬、根系分泌物、绿肥或圈肥等对反硝化作用往往有促进作用 (Avalakki *et al.*, 1995), 但是如果土壤供氮不足, 反硝化作用反而会下降, 因为作物残茬有较大的碳氮比, 在分解过程中易引起氮的固定 (Fredrickson *et al.*, 1981)。因此在秸秆还田时如果配施氮肥, 反硝化损失氮量应该是增加的 (Aulakh *et al.*, 1984)。有机碳供应不足时,  $\text{NO}_3^-$  浓度增加并不影响反硝化速率。

土壤有机碳数量、组成和有机碳库量变化受诸多因素影响, 包括土地利用方式、施肥水平、耕轮作制度等 (Chantigny, 2003)。土地利用方式的不同, 由于人类活动改变植被类型和施肥管理水平, 带来了物质进入量水平、水分状况、施肥管理等的明显差异, 会导致土壤有机 C 库的显著差别 (李忠佩, 2004)。不同利用方式下, 土壤中有机物质的年进入量差异最大可达 5 倍, 造成土壤有机质的形成和积累量显著不同。可溶性有机碳和水溶性有机碳含量水平也受利用方式的影响, 如林地  $>$  草地  $>$  耕地 (Haynes, 2000)。

### 3.4 氮源

在实验室条件下, 反硝化速率随土壤  $\text{NO}_3^-$  浓度的增加而增加, 但在土壤  $\text{NO}_3^-$  浓度增加到较



高的数值后,反硝化速率稳定在较高的水平,不再增加。由于 $\text{NO}_3^-$ 到 $\text{NO}_2^-$ 的还原酶系表观 $K_m$ 值极低,一般在 $5 \sim 290 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间(Luo *et al.*, 1996),当土壤 $\text{NO}_3^-$ 浓度达到 $25 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,反硝化潜势与土壤 $\text{NO}_3^-$ 浓度无关,即呈零级反应(Limmer and Steele, 1982)。当土壤 $\text{NO}_3^-$ 浓度低于 $40 \mu\text{gN} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,土壤反硝化反应呈一级反应,此时土壤生物反硝化速率完全决定于 $\text{NO}_3^-$ 在土壤溶液中的扩散速率(Knowles, 1981)。在自然条件下,水分含量、有效碳、硝态氮源等因素间相互作用,因而硝酸盐浓度与反硝化损失之间通常没有表现出显著的相关关系(Aulakh *et al.*, 1984)。这是由于硝酸盐浓度、有效碳、通气状况及微生物分布的不均一性造成的,所以在自然土壤中要解释反硝化作用动力学是有困难的,更何况田间条件下频繁而严重的干湿交替等过程使问题变得更加复杂。而实验室条件下,当反硝化不受有机碳供应和水分含量限制时, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度是反硝化速率主要限制因素(Cai, 2001)。当 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 不成为反硝化的限制因素时,那么C的供应就成为限制反硝化强弱的主要因素。C/N比值较大可能会降低反硝化的氮损失(Aulakh *et al.*, 1991)。

### 3.5 土壤 pH

土壤 pH 对反硝化的影响目前还无一定论。反硝化作用的最佳 pH 取决于土壤中微生物的种类以及 $\text{NO}_3^-$ 浓度状况(Delwiche and Bryan, 1976),绝大多数反硝化微生物生长的最佳 pH 范围在 $6 \sim 8$ 之间,因此通常认为适宜反硝化进行的土壤 pH 范围是 $6 \sim 8$ 之间。反硝化速率随 pH 的升高而升高(Hofstra and Bouwman, 2005)。虽然弱碱性环境有利于反硝化过程,但研究也发现在自然的酸性土壤上即使 pH 低至 3.5 时,仍有明显的反硝化损失(Weier and Gilliam, 1986)。长期的酸性土壤环境使一些反硝化微生物适应了这种低 pH 环境(Parkin *et al.*, 1985)。Muller 等(1980)发现在瑞典和芬兰的酸性土壤上反硝化速率与土壤 pH 之间呈现正相关关系。

关于酸性条件下反硝化作用减弱的机制问题至今还不清楚。其原因可能在于:① $\text{H}^+$ 直接影响了反硝化细菌的活性;②低 pH 引起养分的缺乏或中毒而间接影响反硝化作用。例如 pH 降低会引起 Mo 有效性的下降,从而减弱硝酸还原酶的合成,不过 Bremner 和 Shaw (1958) 在研究中发现向 pH 为 3.6 的土壤中加入 Mo 并没有促进反硝化作用。Koskinen 和 Keeney (1982) 认为 pH 没有直接控制反硝化作用,而是通过控制反硝化微生物碳的有效性来间接影响反硝化作用,他们推测低 pH 下,碳的有效性可能限制了酸性土壤中反硝化微生物种群的大小,因而间接影响反硝化作用。但这种假设无法支持 Parkin 等(1985)在农田土壤上的观察结果。另外,Firestone (1982) 推测降低 pH,会引起硝酸盐还原中间产物 $\text{NO}_2^-$ 的累积以及铝与锰的溶解而导致毒害效应。

不同土地利用方式对土壤 pH 有显著影响。种植茶树通常使土壤的 pH 显著降低,交换性铝的含量则将不同程度升高。但受施用石灰的影响土壤交换性铝的含量将降低(郭荣发和杨杰文, 2004)。种植水稻将提高土壤的 pH 和交换性铝的含量。造成这种现象的原因有:①对于酸性土壤,渍水后 pH 迅速上升;②淹水条件下,有机质分解时产生的还原性物质使土壤中的铁、锰氧化物等被还原,在此过程中消耗了溶液中的氢离子,使土壤 pH 升高;③一般情况下灌溉用水是中性的(郭荣发和杨杰文, 2004)。

### 3.6 土壤质地

土壤质地对反硝化的影响主要是通过土壤结构、孔隙大小、团粒以及导水速率等物理因素的变化状况而进行的。通常质地较重的黏壤反硝化强于质地较轻的砂壤,即随着土壤质地变细反硝化作用增强(砂壤 < 壤土 < 黏壤)(van Cleemput, 1998)。在这些研究中土壤水分含量与质地细度直接相关,而土壤通气状况与质地细度成负相关关系。排水不良的土壤反硝化氮素损失可达施

入氮量的 50% (van Cleemput, 1998)。

土壤质地和结构受母质类型的影响很大,以花岗岩、第四纪红土和红砂岩三种母质为例,由于脱硅化成土过程的原因,土壤黏粒含量第四纪红土 > 红砂岩 > 花岗岩 (Zhao, 2002)。

### 3.7 植物根系

植物根系分泌物和根系脱落物进入土壤增加了碳源,同时植物根系的活动使根系周围土壤的通气状况、水分条件以及 pH 与根外土壤不同,因此植物根系能提高反硝化作用 (Bakken, 1988)。Wheatley 等 (1991) 研究了马铃薯生长对土壤反硝化的影响,发现反硝化活性有两个高峰,第一个高峰在新根生长期,第二个高峰在侧根生长期,并指出植物根系对反硝化的影响机制与加入有机碳有所不同,除作为能源物质外,前者可能还包含有根系分泌物或其代谢产物对反硝化的促进作用。而 Firestone 和 Davidson (1989) 认为在陆地生态系统中,植物根系具有以下作用:①由于根系及根际微生物的呼吸降低  $O_2$  的有效性;②通过土壤水的吸收运移促进气体扩散而增加  $O_2$  的有效性;③通过根分泌物增加碳的有效性;④根系吸收  $NO_3^-$  而降低氮氧化物的有效性。因此植物根系对反硝化的影响情况复杂,应根据具体的土壤条件进行深入分析,有利于加深对反硝化作用机制的认识。

### 3.8 耕作制度

免耕土壤比常规耕作土壤有较多的土壤水分和较小的空隙度,生物反硝化作用强于耕作土壤。免耕也比传统耕作导致更高的土壤表层 C 累积,从而增强反硝化作用。Staley 等 (1990) 发现,免耕条件下,表层土壤的反硝化势是常规耕作的 2 倍,但对下层土壤反硝化势的影响则不大。Rice 和 Smith (1984) 研究玉米地在免耕和常规耕作条件下的反硝化速率,二者之比都大于 1,最高的达到 77。这主要是因为免耕条件下表层土壤含水量因有作物残茬覆盖而较高,从而促进了反硝化。Parkin 等 (1987) 的研究也表明玉米地免耕处理的土壤反硝化活性显著高于常规耕作处理。一般认为,作物残茬的覆盖有利于土壤保持较多的水分,同时覆盖物提供了能源物质,因此免耕可以促进反硝化损失。

### 3.9 微生物

反硝化作用受土壤微生物的调控,而微生物种群组成和活性是由土壤理化性质 (如土壤水分、质地、结构、pH、 $NO_3^-$ 、 $NH_4^+$ 、 $O_2$ ) 和土地利用与管理方式共同决定的。土地利用方式通过影响土壤理化性质而在微生物的数量、区系组成和多样性方面起决定作用,进而影响和调控反硝化过程。

不同土地利用方式能显著影响微生物多样性。碳素利用 (BIOLOG) 及磷酸酯脂肪酸 (PLFA) 法的研究结果表明,不同利用方式具有不同的微生物群落功能多样性和结构多样性。碳素利用法的研究结果显示,茶园土中微生物对各类碳源的利用能力均很低,呈现出非常独特的微生物功能多样性 (姚槐应等, 2003),可能是因为茶树根系分泌物对微生物有一定的胁迫效应 (Pandey and Palnil, 1996)。

土地利用方式还影响微生物种群结构。利用分子技术手段对反硝化功能基因的研究表明,反硝化微生物种群组成在耕地与荒地 (Stres *et al.*, 2004),沼泽地与农田 (Rich and Myrold, 2004),湿地与林地 (Prieme *et al.*, 2002),林地和草地 (Rich *et al.*, 2003) 之间存在显著差异。利用分子探针技术发现根际周围的反硝化 *nirS*, *nirK* 和 *nosZ* 基因较土体更为丰富 (Stephanie *et al.*, 2006),证明根际土壤中反硝化菌更多。

不同利用方式下,土壤微生物区系组成有较大差异。水田以细菌为主,占总菌群的 76.83%;旱地中真菌和放线菌的比例显著上升,分别占总菌群的 25.68% 和 22.57%;林地中真



菌的比例在三种土壤类型中最高, 达到 48.52%。同时发现, 林地中有丰富的高等担子菌 (史央等, 2002)。

土地利用方式明显影响土壤微生物量, 以荒地最低, 其次为林地和旱地, 最高为菜地和水田 (史央等, 2002)。究其原因是在不同利用方式下, 原本一致的土壤属性发生了改变, 如保肥持水性等, 从而引起有机质矿化速度和养分含量发生变化, 最终影响土壤微生物量。土壤微生物量与有机质以及有效养分之间存在较好的相关性, 可以作为土壤肥力的活指标, 它直接指示着有机质矿化程度和有效养分的水平。

### 3.10 土样制备和存放过程对反硝化的影响

除了土壤理化性质会影响反硝化强度外, 土样制备方法 (鲜土或风干土)、贮存时间的长短和贮存温度都会通过影响有效态碳含量、反硝化微生物数量和反硝化酶活性而影响反硝化强度。Luo 等 (1996) 研究发现, 新鲜土壤在 2 °C 或 20 °C 的温度条件下可保持 DEA 活性 5 天, 之后贮存时间越长, 反硝化活性降低得越多。反硝化菌种群组成的改变; 反硝化酶的活性随保存时间延长而降低; 易矿化有效态 C 的降低, 是造成新鲜土样反硝化强度随贮存时间延长而降低的原因。

贮存温度从 20 °C 降至 2 °C 不能防止新鲜土反硝化强度的降低, 但可延缓风干土反硝化活性的降低, 但长期保存也会使反硝化微生物数量和反硝化酶活性下降 (Luo *et al.*, 1996)。低温有利于保持反硝化细菌的数量, 但却显著抑制它们的反硝化活力 (王连峰和蔡祖聪, 2004), 低于 4~5 °C 条件下反硝化将停止 (Jordan, 1989), 但 Limmer 和 Steele (1982) 证实 在 4 °C 的温度条件下仍能进行明显的反硝化。

风干土壤促进了反硝化的进行, 主要是由于风干效应促进了土壤有机碳的分解和矿化, 从而导致土壤有机碳有效性的提高 (Luo *et al.*, 1996), 土样风干过程中部分微生物死亡, 也是土壤有效态有机碳的来源之一 (Agarwal *et al.*, 1971)。风干土壤重新淹水后, 可物理释放出原来不能为微生物利用的稳定态有机碳。

土壤厌氧培养开始前的好气条件下的贮存时间长短影响还原酶的数量、合成和产物比例, 如  $\text{NO}_2^-$  还原酶和  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的合成随好气条件下的贮存时间的延长而下降, 好气条件下的贮存时间越长,  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶受到的抑制效应较其他还原酶越大, 从而导致  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  比例上升 (Dendooven and Anderson, 1995)。

## 4. 反硝化作用的定量研究方法

研究反硝化作用的方法大致分为田间原位测定方法和实验室培养测定方法两类。根据测定的是产物还是反硝化底物的不同, 一般分为直接气体产物测定法、间接平衡差减法 and 底物消失速率测定法。直接方法是指运用专用设备直接测定氮反硝化作用产物的方法, 而间接方法则是根据土壤中  $\text{NO}_3^-$  的消失数量或者施入氮肥的去向与平衡研究来计算反硝化损失的方法。底物消失速率测定法是监测土壤中  $\text{NO}_3^-$  的消失速率来反应土壤反硝化作用强度。根据测定中所用试剂的不同, 又将其分为  $^{15}\text{N}$  方法和乙炔抑制法。

总体而言, 反硝化作用研究中利用  $^{15}\text{N}$  技术的方法大致可分为 5 类: ①  $^{15}\text{N}$  自然丰度法 (Mariotti *et al.*, 1982); ②  $^{15}\text{N}$  平衡差值法 (Meyer *et al.*, 1989); ③  $^{15}\text{NO}_3^-$  同位素稀释法 (Myrold and Tiedje, 1985); ④  $^{15}\text{N}$  - 气体通量法 (Siegel *et al.*, 1982); ⑤  $^{15}\text{N}_2$  - 气体同位素稀释

方法。尽管 $^{15}\text{N}$ 平衡差值法比直接测定的 $^{15}\text{N}$ -气体通量法得到的结果偏高,有人将这一差异归结为间接平衡差减法包含了多项累积的系统误差(Heising and Schink, 1998)和含氮气体在淹水土壤中的扩散速率低(约为空气中的万分之一)等原因,但两种测定方法间存在显著相关性(Pu *et al.*, 2001)。

Fedorova 等(1973)发现乙炔(10 kPa)可以抑制反硝化作用中 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 的还原过程,这一发现构成了乙炔抑制法的理论基础。乙炔抑制方法中包括箱技术法(Colbourn *et al.*, 1984)、土柱培养法(Svensson *et al.*, 1985)以及实验室土壤培养法等。乙炔抑制法具有如下优点:①单位面积取样成本很低;②方法简单;③检测限低( $1 \text{ gN} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ );④可以用于不施肥的自然土壤的反硝化测定。

而该方法的主要问题包括8个方面即:①在土壤碳含量较高而 $\text{NO}_3^-$ 浓度较低时可能促进 $\text{N}_2\text{O}$ 的还原而使乙炔缺乏抑制效果(Rudolph *et al.*, 1991);②乙炔在好氧和厌氧条件下都能发生降解,尤其在厌氧条件下的稻田中其降解速率可影响反硝化的测定;③低浓度乙炔也抑制硝化作用(Wrage *et al.*, 2004),不能用于研究硝化细菌反硝化途径导致的 $\text{N}_2\text{O}$ 还原;④乙炔也可作为碳源参与代谢反应,导致浓度降低,抑制效果下降(Klmedtsson *et al.*, 1990);⑤乙炔、 $\text{N}_2\text{O}$ 与硫化物间的相互作用;⑥乙炔中的杂质与纯化问题;⑦乙炔也对反硝化产生影响,即可促进反硝化(Yeomans and Beauchamp, 1982),但也有人认为不会对反硝化产生影响(Nielsen *et al.*, 1994);⑧乙炔在 $\text{O}_2$ 浓度极低的条件下( $200 \text{ uL} \cdot \text{L}^{-1}$ )也能催化NO的氧化,使得 $\text{N}_2\text{O}$ 产生的底物减少,从而低估反硝化作用(Dunfield and Knowles, 1997),但也有人认为在碳氮充足的厌氧土壤中,微量氧气的存在并不会使这一反应对长期反硝化测定造成显著影响(Murray and Knowles, 2003)。

不同测定方法测得值差异很大。如:李亚星(1993)的研究结果表明(乙炔抑制箱法),北京地区小麦生育期田间反硝化作用损失氮量仅占施肥量的1.08%。邹国元等(1997)利用差值法测得北京水稻土氮的反硝化损失达38.9%,而采用 $^{15}\text{N}$ 示踪-气体通量法测得的反硝化损失仅为0.26%。乙炔抑制-原状土柱法(蔡贵信等, 1999)的研究结果表明,潮土上玉米喇叭口期表施尿素的反硝化损失为11%;深施时的反硝化损失为2.5%,硝化反硝化损失总量约为施氮量的4.5%。这一测定结果较范晓晖(1995)和朱兆良(2000)用 $^{15}\text{N}$ 示踪-气体通量法的测定值要高。综合现有工作来看,由于测定方法的困扰,氮的反硝化损失研究还有较长的路要走。

自然环境条件下,影响反硝化作用的环境因子很多且相互联系,难以进行概念上的区分并建立模型,而且,田间条件难以同时满足反硝化的三个必备条件( $\text{O}_2$ 、 $\text{NO}_3^-$ 和有机C)处于最佳状态,与田间测定相比,控制条件下进行培养试验可优化反硝化进行的条件,是研究土壤氮素反硝化行之有效的方法之一。Šimek 等(2004)比较了不同室内培养实验反硝化势测定方法,即 $\text{N}_2\text{O}$ 排放通量、反硝化潜势(DP)、反硝化酶活性(DEA),反硝化速率(DR)测定法之间的差异。其中DR测定的是原状土柱反硝化 $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ 净排放量;DEA和DP表征的是反硝化潜势,前者反映的是田间状态下土壤中即存的反硝化酶活性对加入氮(碳)后几个小时的响应能力,培养时间不超过5 h(Luo *et al.*, 1996);后者表征的是厌氧条件下土壤反硝化微生物在加入碳、氮后一定时期内快速增长的潜势,培养时间从几天到几个月不等。Šimek 等(2004)认为 $\text{N}_2\text{O}$ 排放通量与大多数土壤理化指标无关;DP与 $\text{N}_2\text{O}$ 排放通量间无相关性;DEA虽与 $\text{N}_2\text{O}$ 排放通量无显著相关性,但增大样本数量,提高样本代表性,DEA可很好地表征 $\text{N}_2\text{O}$ 排放通量,但尚需试验证明;唯一与 $\text{N}_2\text{O}$ 排放通量呈显著相关的是土柱法测定的DR。



由上述可知, 由于土样采集后和测定前的处理方法、测定方法、培养时间长短等的不同, 难以进行不同培养试验结果之间的直接比较。

## 5. 土壤氮素反硝化的环境效应

### 5.1 农田土壤氮素反硝化造成氮素损失

对土壤氮素反硝化损失的测算主要集中在农田土壤, 而对于非农田土壤则相对较少。对于农业土壤中氮肥反硝化损失的定量评价长期以来一直是困扰各国研究者的一个重要问题。

约从 20 世纪 80 年代以来, 许多研究者采用乙炔抑制法和 $^{15}\text{N}$ 示踪-气体通量法对田间条件下农田土壤中化肥氮的反硝化损失进行了许多原位观测。不同利用方式下以及同一利用方式下土壤肥料氮的反硝化损失量测算结果之间差异很大, 如草地反硝化损失氮量占施氮量低至 1.0% (Agustín *et al.*, 2004), 高者达 3.8% ~ 25% (Javis *et al.*, 1991)。某些研究者估计的农田  $\text{N}_2\text{O}$  损失量占施氮量的百分比为 0.5% ~ 1.25% (Agustín *et al.*, 2004), 而 Aulakh 等 (1992) 认为耕地土壤反硝化损失量占施氮量的 10%, 且随着土壤水分和作为电子供体的有机碳有效性的增大而上升。通常草地土壤反硝化损失高于耕地土壤。但有研究表明, 虽然旱地土壤通常反硝化作用较弱, 但一旦有淹水条件存在, 则反硝化进行得很快 (Aulakh, 1989), 例如施肥后的灌溉或者降水均是合适的条件。

旱地农田土壤不同作物间反硝化损失量也存在较大差异, 据报道, 冬小麦旱地反硝化损失氮占施氮量 1% ~ 7.5% 之间不等 (李亚星, 1993); 玉米反硝化氮占施氮量的 1% ~ 5%; Svensson 等 (1991) 用原状土培育-乙炔抑制法测定大麦地上施用硝酸钙后的反硝化损失氮占施入氮的 3% ~ 5%。

上述测定结果表明, 不同利用方式下土壤中氮的反硝化损失率有较大变幅, 这与不同试验采用的试验方法不同有关, 还与气候、土壤类型、土壤含水量和土壤有效碳量以及施氮量等不同有关。

Zhu (1997) 对中国稻田土壤反硝化进行总结指出, 施用的氮肥中有 33% ~ 41% 通过反硝化而损失。Cai 等 (1998) 分析旱地反硝化时得出, 中国施用于旱地的氮肥有 13% ~ 29% 通过反硝化而损失。据此, Xing 和 Zhu (1999) 对中国农业土壤反硝化损失氮量进行过估算, 发现 1995 年中国稻田施用氮肥后反硝化损失氮量为 1.65 ~ 2.05 Tg N, 而旱地为 2.23 ~ 4.99 Tg N。另外, 关于有机氮的反硝化损失国内缺乏相关数据。Xing 和 Zhu (1999) 估计其损失比率要低于化肥, 以化肥氮损失率的一半来进行计算, 即稻田为 16% ~ 20%, 旱地为 6% ~ 14%, 得出我国稻田及旱地有机氮反硝化总损失值分别为 0.53 ~ 0.66 和 0.59 ~ 1.33 Tg N。因此, 1995 年中国有机肥及化肥氮的反硝化总损失量达到了 5 ~ 9.03 Tg N。

以差减法为基础获得的表观硝化反硝化损失率分别为水稻土壤上 16% ~ 41%、旱作土壤上 15% ~ 18% (朱兆良, 2000)。根据田间观测到的排放通量数据进行外推, Xing 和 Zhu (1999) 分别计算了中国旱地和稻田冬季作物和水稻生长季  $\text{N}_2\text{O}$  排放量, 结果显示华北旱地土壤  $\text{N}_2\text{O}$  平均排放量为  $30.6 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , 而中国稻田  $\text{N}_2\text{O}$  平均排放量为  $39.5 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。针对上述数据分析可以发现, 土壤硝化反硝化损失是水稻土上氮素损失的主要途径, 而旱作土壤上硝化反硝化损失也在氮素总损失中发挥了重要的作用。目前国内尚缺乏直接测定的数据。继续开展水稻土壤及旱地土壤硝化反硝化作用的直接测定研究是有必要的。

李长生等(2003)运用 DNDC 模型,估算中国 1990 年  $\text{N}_2\text{O}$  排放量约为  $0.13 \text{ Tg N} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ 。根据全球增温潜势(GWP)的计算,中国农田释放的  $\text{N}_2\text{O}$  对全球增温的影响要高于  $\text{CO}_2$  和  $\text{CH}_4$ , 对中国农田的 GWP 贡献达到 50%。王效科和李长生(2000)根据 DNDC 模型估计,中国农业土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放总量为  $0.31 (0.18 \sim 0.44) \text{ Tg N} \cdot \text{a}^{-1}$ , 平均排放量为  $3.58 \text{ Gt N} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ , 该结果与 Xing 和 Zhu (1999) 利用 IPCC 的方法估计结果接近,而高于李长生的估计。

## 5.2 反硝化是产生温室气体 $\text{N}_2\text{O}$ 的主要途径之一

反硝化的气态产物为  $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  (Payne, 1981)。反硝化作用的环境效应取决于其所产生的终产物,以及不同产物间的比例。 $\text{N}_2\text{O}$  是重要的温室气体之一,参与大气光化学反应,破坏臭氧层。在百年时间尺度上  $\text{N}_2\text{O}$  的全球增温潜势是  $\text{CO}_2$  的 296 倍,其在大气中的寿命为 120 年 (IPCC, 2001)。自 1988 年以来  $\text{N}_2\text{O}$  以每年  $0.8 \times 10^{-9}$  的速率增长,2004 年浓度达  $318.6 \times 10^{-9}$  (WDCGG, 2004),比工业革命前 ( $270 \times 10^{-9}$ ) 增长了大约 18%。全球  $\text{N}_2\text{O}$  年排放量是  $16.4 \text{ Tg}$ , 其中土壤是  $\text{N}_2\text{O}$  重要的排放源,约占年总排放量的 62.2% (IPCC, 2001),施肥农业土壤上排放的  $\text{N}_2\text{O} - \text{N}$  约为  $2.8 \text{ Tg}$  (Bouwman *et al.*, 2002)。 $\text{NO}$  虽然不是温室气体,但其是大气中的活性物质,对流层中易氧化成  $\text{NO}_2$ , 促进  $\text{O}_3$  的形成 (Derwent, 1999),  $\text{NO}$  也是形成酸雨和光化学烟雾的前提物质 (Crutzen, 1979)。全球土壤排放的  $\text{NO}$  估计为  $4 \sim 21 \text{ Tg N} \cdot \text{a}^{-1}$  (Davidson and Kinglerlee, 1997),其中施肥农业土壤上排放的  $\text{NO} - \text{N}$  为  $1.6 \text{ Tg}$  (Bouwman *et al.*, 2002),由土壤硝化和反硝化产生的  $\text{NO}$  占总排放量的 35% (Bouwman, 1990)。关于  $\text{NO}$  方面的研究文献中多为自然田间状态下或室内培养条件下由硝化和反硝化过程共同产生的  $\text{NO}$  总和 (Akiyama *et al.*, 2004),反硝化过程中  $\text{NO}$  产生的条件和机制尚不完全清楚 (Maljanen *et al.*, 2007),因此关于单独由反硝化过程产生  $\text{NO}$  的报道很少 (Ludwig *et al.*, 2001),甚至在水分饱和和土壤中观测不到  $\text{NO}$  的排放 (Wolf and Russow, 2000)。因此,本文仅就影响反硝化气态产物  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  及其比例的土壤因素综述如下。

### 5.2.1 研究反硝化气态产物的方法

反硝化产生的温室气体  $\text{N}_2\text{O}$  可被进一步还原成  $\text{N}_2$ , 研究土壤还原  $\text{N}_2\text{O}$  的方法有乙炔抑制法 (Yoshinari *et al.*, 1977)、稳定性同位素示踪法 (Well *et al.*, 2005) 和分子生物学方法等。其中前两种方法在前面的章节中已介绍。分子生物学方法包括应用 PCR 方法检测某些重要基因,如  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶 *nosZ* 基因的存在与否 (Zumft *et al.*, 1990),或者研究微生物群落对  $\text{N}_2\text{O}$  还原的影响。然而这些方法都存在一些不确定性,如 *nosZ* 基因的存在并不意味着  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的存在和其活性的存在,Chéneby 等 (1998) 认为 *nosZ* 基因与  $\text{N}_2\text{O}$  还原能力之间关系微弱。尽管目前有一些研究方法探讨  $\text{N}_2\text{O}$  的还原,但尚无原位定量研究的可行方法。

### 5.2.2 影响反硝化气态产物的因素

反硝化作用的主要终产物是  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$ , 其中  $\text{N}_2\text{O}$  所占的比例变化很大,变幅在  $0 \sim 100\%$  (Aulakh *et al.*, 1992)。通常认为  $\text{NO}$  并不是土壤或水体中反硝化作用的主要终产物。 $\text{N}_2\text{O}$  的净排放量取决于  $\text{N}_2\text{O}$  的产生速率和还原速率的相对大小,当  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率大于还原速率时,则有  $\text{N}_2\text{O}$  的净排放,否则有  $\text{N}_2\text{O}$  的净消耗。影响反硝化产物比例的土壤因素有很多,如土壤理化性质(土壤质地、水分、有机质含量、土壤 pH),作物类型、气候因素和施氮量等 (Bouwman *et al.*, 2002),还受反硝化微生物种群组成、结构和酶活性等的影响 (Holtan-Hartwig *et al.*, 2000),现分述如下:

(1) 土壤 pH: pH 是影响  $\text{N}_2\text{O}$  还原的因素之一。 $\text{N}_2\text{O}$  还原酶对酸性条件比较敏感,因此通



常认为低 pH 抑制  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶 (Nor) 活性 (Knowele, 1982), 随土壤 pH 由酸性 (pH3 ~ 5) — 中性—弱碱性的过程, 反硝化作用速率增强,  $\text{N}_2\text{O}$  排放量增大。当土壤 pH 大于 5 ~ 6 时, 反硝化作用产物比率  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  随 pH 升高而下降 (Stevens *et al.*, 1998)。因此酸性土壤中有利于  $\text{N}_2\text{O}$  的产生 (Weier *et al.*, 1993), 而高 pH 时促进反硝化生成氮气 (Hu *et al.*, 2001)。

但是由于反硝化作用随 pH 升高而加强, 促进  $\text{N}_2\text{O}$  生成的同时也促进了  $\text{N}_2\text{O}$  的还原, 两者的相对速率还受其他因素的共同影响, 因此  $\text{N}_2\text{O}$  的净排放量与 pH 的关系是不明确的。例如 Bandibas 等 (1994) 认为  $\text{N}_2\text{O}$  的排放量随 pH 升高而升高, 而一些研究者 (Struwe and Kjoller, 1994) 则认为两者之间不存在相关性。以上结果表明, pH 对反硝化微生物种群组成和酶活性影响复杂, pH 通过影响酶合成的滞后时间和数量而影响反硝化活性和产物比例 (Ellis *et al.*, 1996)。有关这一方面的工作有待加强。

(2) 土壤盐碱度: Nor 同样也受到土壤盐碱程度的抑制, Menyailo 等 (1997) 发现  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶活性随着土壤盐分含量的增加而下降。

(3) 土壤通气状况/水分含量: 不同反硝化酶对  $\text{O}_2$  的敏感程度不同 (Cavigelli and Robertson, 2001), Nor 较其他反硝化酶对  $\text{O}_2$  更为敏感 (Knowele, 1982)。高  $\text{O}_2$  浓度抑制  $\text{N}_2\text{O}$  还原, 因此随土壤含水量的增加土壤逐步进入厌氧过程,  $E_h$  降低, 此时反硝化作用产物  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  比例呈下降趋势 (Weier *et al.*, 1993)。 $\text{N}_2\text{O}$  排放通量随土壤含水量的增加而加大, 土壤水分含量高, 可促进  $\text{N}_2\text{O}$  的还原 (Khalil *et al.*, 2002)。在土壤干湿交替过程中,  $\text{N}_2\text{O}$  排放往往是非常显著的。

(4) 土壤质地与氧化还原电位: 土壤质地通过影响  $\text{N}_2\text{O}$  在土壤剖面的扩散难易程度而影响  $\text{N}_2\text{O}$  的还原强度 (Wzodarczyk *et al.*, 2005)。通常当氧化物的有效性大于还原物的供应时,  $E_h$  较高, 氮氧化物就不能完全还原, 因而产物中  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  比值较高。与此相反, 当反硝化作用速率受氧化物供应的限制时, 那么绝大多数的氮氧化物都将转化为  $\text{N}_2$ 。

(5) 氮肥:  $\text{NO}_3^-$  浓度也是影响反硝化产物的因素之一。通常认为高浓度的  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  会抑制  $\text{N}_2\text{O}$  还原为  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  比值较高 (Weier *et al.*, 1993)。但也有人认为, 土壤  $\text{NO}_3^-$  含量只是影响反硝化速率, 并不影响反硝化气态产物  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  的比值。

关于能抑制  $\text{N}_2\text{O}$  还原的  $\text{NO}_3^-$  浓度阈值的报道不一, 如 Luo 等 (1996) 认为  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度 >  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  会抑制  $\text{N}_2\text{O}$  的产生。而有的学者认为其浓度范围在  $10 \sim 30 \text{ mg NO}_3^- - \text{N} \cdot \text{kg}^{-1}$  即足以抑制上述过程 (Cho and Mills, 1979)。通常在施肥后农田土壤  $\text{NO}_3^-$  浓度可达到这一标准。施用氮肥后通常会有一至数周的  $\text{N}_2\text{O}$  排放高峰 (Astorga *et al.*, 1996)。 $\text{NO}_3^-$  对  $\text{N}_2\text{O}$  的还原抑制效应是暂时的, 在极端还原的条件下, 由于对电子受体的大量需求,  $\text{NO}_3^-$  对  $\text{N}_2\text{O}$  的还原抑制作用急剧下降直至抑制消失。

高浓度的  $\text{NO}_3^-$  不仅抑制  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的合成和活性, 而且也能抑制 NO 还原酶和  $\text{NO}_2^-$  还原酶的合成及活性 (Gaskell *et al.*, 1981)。Cho 和 Skdinan (1978) 认为是  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{N}_2\text{O}$  之间竞争电子造成的, 只有当  $\text{NO}_3^-$  含量很低时, 大气或土壤中的  $\text{N}_2\text{O}$  才能作为唯一电子受体被还原 (Rosenkranz *et al.*, 2005)。而相反观点认为较高浓度的  $\text{NO}_3^-$  (10 mM) 或  $\text{NO}_2^-$  (0.5 mM) 不会抑制某些反硝化菌种  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的活性。Ellis 等 (1996) 也发现在  $\text{NO}_3^-$  浓度较高的情况也能发生  $\text{N}_2\text{O}$  的还原, 而且  $\text{N}_2\text{O}$  还原得比  $\text{NO}_3^-$  更快, 这似乎意味着土壤剖面中积累的反硝化过程中早期生成的  $\text{N}_2\text{O}$  如不及时排放至大气, 迟早将被还原为  $\text{N}_2$ 。

(6) 土壤有机碳: 土壤有机碳既可以促进反硝化产生  $\text{N}_2\text{O}$ , 也可以促进  $\text{N}_2\text{O}$  的还原。一般

来说,  $\text{N}_2\text{O}$  排放量是随有机碳含量, 尤其是有效碳含量的增加而增加的。有机土上  $\text{N}_2\text{O}$  排放量要高出矿质土一个数量级或更多 (Duxbury, 1984)。有机质不但提供了有机碳, 而且也提供了易矿化氮, 因此促进反硝化作用 (Comfort *et al.*, 1990)。 $\text{N}_2\text{O}$  排放通量随有机质 C/N 比下降而增大 (Bremner and Blackmer, 1981)。土壤有机 C 有效性高也有助于  $\text{N}_2\text{O}$  的还原, 随着土壤有机碳有效性的提高,  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  的比值降低 (Weier *et al.*, 1993)。因为丰富的有机碳促进了土壤微生物的呼吸, 形成微域厌氧环境, 有利于  $\text{N}_2\text{O}$  还原的进行 (Mathieu *et al.*, 2006)。

(7) 温度: 关于温度对  $\text{N}_2\text{O}$  还原的影响, 研究结果不一。Yamulki 等 (1995) 认为土壤温度与  $\text{N}_2\text{O}$  还原速率呈正相关, 温度在  $5^\circ\text{C}$  以上微生物活动增强, 促进  $\text{N}_2\text{O}$  的还原, 反硝化产物比率  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  随之下降 (Goossens *et al.*, 2001)。但 Donoso 等 (1993) 发现晚上  $\text{N}_2\text{O}$  还原的量较白天多, 土壤温度和  $\text{N}_2\text{O}$  净消耗之间呈负相关。土壤温度的升高有助于提高微生物活性和气体扩散速率, 但同时也降低了溶解到水里的  $\text{N}_2\text{O}$  的量 (Heincke and Kaupenjohann, 1999), 因此, 温度对  $\text{N}_2\text{O}$  净消耗的影响比较复杂, 似乎也表明土壤温度的影响是间接的。

(8) 培养或观测时期的长短: 反硝化厌氧培养时间长短会影响反硝化的产物及产物的比例 (Cavigelli and Robertson, 2001)。在反硝化过程的起始阶段,  $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$  比率一般较低 (1~5), 随着反硝化继续进行, 该比率才趋于增大, 在极端厌氧条件下, 形成的  $\text{N}_2$  为  $\text{N}_2\text{O}$  的 20 倍 (Rolston *et al.*, 1978)。这是由于  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的合成滞后于  $\text{NO}_3^-$  还原酶、 $\text{NO}_2^-$  还原酶、 $\text{NO}$  还原酶的合成, 而且当  $\text{NO}_3^-$  浓度越高时, 合成滞后的时间越长, 因此有  $\text{N}_2\text{O}$  的暂时积累, 且  $\text{N}_2\text{O}$  的排放先于  $\text{N}_2$  的排放 (Holtan-Hartwig *et al.*, 2000)。

(9) 反硝化微生物种群组成: 过去的研究多注重于土壤物理、化学性质和底物供给对反硝化作用和  $\text{N}_2\text{O}$  排放的影响。近来, 越来越多的研究关注于反硝化微生物种群组成、酶活性等生理特性对反硝化过程和产物的影响。不同土壤反硝化微生物种群组成对调节反硝化速率和  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  至关重要 (Avrahami *et al.*, 2002; Rich *et al.*, 2003)。反硝化过程中之所以不同产物能同时存在, 且产物之间的比例不同, 是由于反硝化过程由三个可独立进行的步骤组成, 即① $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ; ② $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ; 和③ $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  (Zumft, 1999), 各步骤反应平衡常数  $\lg K$  分别为 28.64, 46.88, 29.63 (Verdegem and Baert, 1985)。但这并不意味着反硝化严格按照这样的顺序进行, 而是根据不同反硝化酶动力学性质交替进行 (Firestone, 1982)。多数反硝化细菌具有还原  $\text{NO}_3^-$  至  $\text{N}_2$  所必需的全部还原酶系统, 但有些则缺乏  $\text{NO}_3^-$  还原酶, 只能以  $\text{NO}_2^-$  为电子受体; 而另一些则又缺乏  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶,  $\text{N}_2\text{O}$  是其还原的末端产物; 还有一些虽具有  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶, 但不能以  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  为电子受体产生  $\text{N}_2\text{O}$  (Zumft, 1999)。即使在具有全套还原酶系统的微生物个体中, 某些酶的合成和活性也会受到一些因素的抑制而不能发挥其还原作用, 如某些反硝化菌种  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶较其他还原酶对  $\text{O}_2$  更为敏感 (Cavigelli and Robertson, 2001)。从我国太湖地区各主要类型土壤和江西红壤区土壤中分离的反硝化细菌的酶活性研究结果来看, 具有还原  $\text{NO}_3^-$  成  $\text{NO}_2^-$  酶活性的细菌分别占细菌总数的 50%~80% 和 15%~77%; 具有还原  $\text{NO}_3^-$  为  $\text{N}_2\text{O}$  酶活性的分别占供试菌株的 67% 和 60%; 具有  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶活性的分别占供试菌株的 56% 和 58% (李振高等, 1989), 而据国外报道, 反硝化菌中具有  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶活性的占到 72% (Okereke, 1993)。除反硝化微生物种群组成外, 反硝化菌数量占微生物数量的比例和还原酶动力学、生物学特性也是影响不同生态系统 (如林地和草地) 之间反硝化差异的主要因素 (Dendooven *et al.*, 1994)。

田间自然条件下, 由于受到其他  $\text{N}_2\text{O}$  还原过程 (硝化细菌反硝化或好氧反硝化) 及其他因素的影响 (与土壤矿物的化学反应等), 这些促进  $\text{N}_2\text{O}$  还原的条件并不是一成不变的, 并且不同



影响因素间交互作用,使问题变得更为复杂。

### 5.2.3 减少农田土壤氮素反硝化损失和 $N_2O$ 排放量的措施

- (1) 运用测土平衡施肥技术,根据目标产量确定氮肥施用量,减少过剩氮肥量;
- (2) 氮肥深施,降低  $N_2O/N_2$  比例;
- (3) 合理确定施用氮肥时间,以满足作物需要同时尽可能减少土壤残留氮为目的;
- (4) 改善氮肥施用措施,采取分次施用氮肥或者施用长效缓释氮肥,但其降低效果不一(曹美秋等,1999;颜晓元等,1999);
- (5) 利用硝化抑制剂,如用电气石包衣的乙炔(Keerthisinghe *et al.*, 1993);
- (6) 提倡农田作物的周年持续覆盖,减少裸地时间,这样可以减少氮的淋洗和反硝化作用并促进养分循环。

### 5.3 反硝化作用影响温室气体 $CH_4$ 的排放

$CH_4$ 也是一种重要的温室气体,100年时间尺度上 $CH_4$ 的GWP(全球增温潜势)是 $CO_2$ 的23倍,且以每年0.5%的速率增长(IPCC, 2001)。 $CH_4$ 的产生通常有两个途径:以 $H_2/CO_2$ 无机物为底物的还原过程和以乙酸等有机物为底物的还原过程。 $CH_4$ 的排放是 $CH_4$ 产生和 $CH_4$ 氧化的净效应。易矿化分解有机碳的有效性是决定甲烷产生的主要因素。

#### 5.3.1 铵态氮肥对 $CH_4$ 氧化的影响

氮素转化过程与甲烷的产生和氧化密切相关,如甲烷氧化菌能够参与硝化和固氮作用。甲烷氧化菌能够在铵氧化(硝化)过程中产生NO和 $N_2O$ ,但不能进行反硝化(Bédard and Knowles, 1989)。铵态氮肥可抑制甲烷氧化(Kravchenko *et al.*, 2002)。 $NH_4^+$ 对 $CH_4$ 氧化的抑制机制复杂,主要机制有3种:

(1) 竞争机制: $NH_4^+$ 对甲烷氧化的抑制是由于 $CH_4$ 和 $NH_4^+$ 在分子形状和大小上的相似性,以及催化 $CH_4$ 和 $NH_4^+$ 氧化反应的单加氧酶相对较低的选择性,使得硝化作用底物 $NH_4^+$ 对甲烷单加氧酶的竞争优势大于甲烷氧化底物 $CH_4$ 对甲烷单加氧酶的竞争,从而甲烷氧化受到抑制(Castro *et al.*, 1994)。 $CH_4$ 氧化菌和铵氧化菌都可以氧化 $CH_4$ 和 $NH_4^+$ ,所以 $CH_4$ 和 $NH_4^+$ 之间的竞争是 $NH_4^+$ 对 $CH_4$ 氧化抑制作用的主要机制(Schimel *et al.*, 1993)。

(2) 亚硝酸毒害作用:有研究发现,加入 $NH_4^+ - N$ 后由于硝化作用产生 $NH_2OH$ 或 $NO_2^- - N$ ,对 $CH_4$ 氧化菌氧化 $CH_4$ 有毒害作用(Kravchenko *et al.*, 2002)。

(3) 溶质效应:一些培养试验结果表明,KCl、NaCl、 $KNO_3$ 和 $NaNO_3$ 对土壤氧化 $CH_4$ 也有一定的抑制作用(Yan and Cai, 1997)。土壤溶液中离子浓度的增加,增加了 $CH_4$ 氧化微生物细胞的渗透势,抑制土壤对 $CH_4$ 的氧化(Neisbit and Breitenbeck, 1992)。因此施用氮肥对土壤溶液溶质浓度的改变可能也是导致土壤 $CH_4$ 氧化能力降低的抑制机制之一。

$NH_4^+$ 是甲烷氧化的重要的抑制剂,但某些情况下,加入 $NH_4^+$ 后,其对 $CH_4$ 氧化的抑制效应并不立即表现出来(Hütsch *et al.*, 1994),甚至促进甲烷的氧化(如铵态氮肥的施入促进了水稻根际土壤甲烷的氧化),其原因为硝化菌的氨单加氧酶和甲烷氧化菌的甲烷单加氧酶结构相似,硝化菌也能氧化 $CH_4$ ,尽管这一反应速率很低。此外,氮素也是甲烷氧化酶合成和甲烷氧化菌活性发挥的前提物质,是土壤或沉积物中甲烷氧化菌生长限制因子之一,对甲烷氧化过程起重要调节作用,因此氮肥的施入也能激发甲烷氧化菌的生长和活性(Bodelier and Laanbroek, 2004)。

综合以上可以看出, $CH_4$ 的氧化和 $N_2O$ 的排放通过氮素转化过程而密切相联。加入 $NH_4^+$ 后,

$\text{CH}_4$ 的氧化量和  $\text{N}_2\text{O}$  的排放量之间既存在正相关,原因是(能进行好氧反硝化的)铵氧化菌在微厌氧条件下对  $\text{CH}_4$ 的直接氧化;也存在负相关,即  $\text{NH}_4^+$ 有效性高,则  $\text{N}_2\text{O}$  排放量大,对  $\text{CH}_4$ 氧化的抑制效果更强,原因是铵氧化菌对  $\text{CH}_4$ 氧化菌的竞争抑制 (Kravchenko *et al.*, 2002)。

### 5.3.2 反硝化作用和 $\text{CH}_4$ 产生的关系

$\text{CH}_4$ 的产生、氧化和反硝化过程密切相关。反硝化作用和甲烷的产生同样都在厌氧条件下进行,都需要有机质提供微生物呼吸底物、能量物质和电子供体分别用于还原  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{CO}_2$ ,理论上  $\text{NO}_3^-$  的还原优先于  $\text{CO}_2$  的还原,两者还原的气体产物 ( $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{CH}_4$ ) 都是重要的温室气体,因此反硝化过程和甲烷生成关系密切,研究两者之间的关系对于综合评价环境效应,制定减排措施具有重要意义。

研究表明,反硝化过程对甲烷的产生有抑制作用,其机理可能有:

(1) 加入的  $\text{NO}_3^-$  同时也是一种氧化剂,通过提高土壤氧化还原电位  $E_h$  减少甲烷的产生 (Roy and Conrad, 1999),同时也促进甲烷的氧化从而降低甲烷排放 (Roy and Conrad, 1999)。这种抑制效果是短期的,加入  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{NO}_3^- - \text{N}$  使土壤  $E_h$  提高了 220 mV,几乎完全抑制甲烷的产生,但是过后不久,加入的  $\text{NO}_3^-$  经反硝化而减少,甲烷产生逐渐增加 (Wang *et al.*, 1992)。但也有人认为  $\text{NO}_3^-$  对  $\text{CH}_4$  的抑制效应主要不是由于  $E_h$  的上升而导致的 (Klüber and Conrad, 1998)。

(2) 厌氧条件下  $\text{NO}_3^-$  和 (或) 其反硝化产物  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  对产甲烷微生物种群或其他微生物的毒害作用和对甲烷产生的竞争抑制作用,其中  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}$  的毒害作用甚至大于竞争作用 (Lovley and Phillips, 1987)。根据这些氮氧化物浓度和产甲烷菌的不同这种抑制效应是可逆或不可逆的 (Klüber and Conrad, 1998)。

(3) 根据热力学原理,氧化还原电位高的电子受体首先被还原,因此厌氧土壤中离子通常按下列顺序还原:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CO}_2$  (Chidthaisong and Conrad, 2000)。因此,  $\text{NO}_3^-$  的施入造成反硝化细菌对乙酸和  $\text{H}_2$  的竞争大于产甲烷菌,从而抑制甲烷的产生 (Chidthaisong and Conrad, 2000)。

(4)  $\text{NO}_3^-$  不仅抑制水稻土中  $\text{CH}_4$  的产生,而且影响产甲烷前提物质 ( $\text{H}_2$ , 乙酸) 和氧化剂  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  的周转 (Klüber and Conrad, 1998)。 $\text{NO}_3^-$  的优先还原使得硫酸盐和  $\text{Fe}^{3+}$  暂时积累,造成硫酸盐还原菌、 $\text{Fe}^{3+}$  还原菌与产甲烷菌竞争  $\text{H}_2$ ,从而抑制甲烷的产生 (Lovley, 1991)。铁还原细菌利用  $\text{CH}_4$  产生前提物质 ( $\text{H}_2$ , 乙酸) 的浓度阈值远远低于产甲烷菌和  $\text{SO}_4^{2-}$  还原菌 (Lovley and Phillips, 1987)。只有在乙酸和  $\text{H}_2$  浓度不成为限制因素时,  $\text{Fe}^{3+}$  的还原和甲烷产生同时进行 (van Bodegom and Stams, 1999)。

总之,理论上在  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  没有被还原完之前是不会有甲烷的产生。然而,自然状况下情况却复杂得多 (Chidthaisong and Conrad, 2000)。

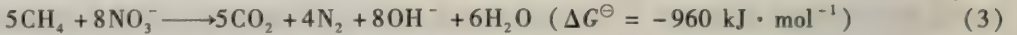
### 5.3.3 反硝化过程和 $\text{CH}_4$ 氧化的关系

大量试验结果证明,硝态氮肥可促进甲烷的氧化。表现在反硝化过程和  $\text{CH}_4$  氧化密切偶联,反硝化菌和甲烷氧化菌密切结合,反硝化菌利用甲烷氧化过程中产生的简单有机碳化合物 (如甲醇、甲醛、甲酸) 作为生活底物和用于反硝化反应 (Knowles, 2005)。此外,甲烷氧化过程中消耗  $\text{O}_2$ ,造成有利于反硝化进行的微区厌氧环境 (Knowles, 2005)。

甲烷在两种环境条件下可作为反硝化的唯一电子供体,即厌氧条件下 (Islas-Lima *et al.*, 2004) 和微厌氧条件下 (Eisentraeger *et al.*, 2001),可能存在反硝化过程和  $\text{CH}_4$  氧化过程的偶联



反应, 方程如下:



但这一反应可能只是在深海海底沉积物中更有意义。

因此, 加入的硝态氮肥既可以抑制甲烷的产生, 也可以促进甲烷的氧化, 从而减少甲烷排放。但也有报道硝态氮肥的施入会抑制旱地或湿地土壤甲烷的氧化, 从而促进甲烷的排放。

#### 5.4 反硝化作用影响铁元素循环

铁是地壳中第四大元素, 也是氧化还原反应最活跃的元素之一 (Hauck *et al.*, 2001)。土壤铁氢氧化物及其铁矿物是土壤表面元素地球化学循环最为活跃的部分, 通过不同价态铁之间的转化与氮素转化过程密切联系, 即氮素转化尤其是反硝化过程可以影响铁元素循环。

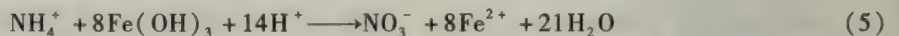
##### 5.4.1 无机氮的转化与铁元素循环

早在 1966 年 Chao 和 Kroontje 等研究表明, Fe 的氧化和还原作用造成无机氮转化的复杂情况。在酸性溶液中,  $\text{NO}_3^-$  可被  $\text{Fe}^{2+}$  还原为  $\text{N}_2$ , 中间产物有  $\text{NO}_2^-$ , NO 和  $\text{N}_2\text{O}$ , 这些顺序产物与生物反硝化过程出现的相似。之后 Sahrawat (1980) 在含有硫酸盐的酸性稻田土壤中发现  $\text{Fe}^{2+}$  可能参与了  $\text{NO}_3^-$  的化学反硝化。Yamane 和 Okazaki (1982) 在培养实验中发现淹水土壤中加入  $\text{NO}_3^-$  后可溶性  $\text{Fe}^{2+}$  的降低。Komatsu 等 (1978) 也发现不同价态的铁离子之间的转化可能参与了淹水条件下的氮素反硝化过程。Savant 和 McClellan (1987) 总结前人的研究工作, 提出了铁氧化物参与淹水土壤中反硝化作用的可能性。

铁不仅能和  $\text{NO}_3^-$  发生反硝化反应, 还有可能参与了硝酸异化还原为铵 (DNRA) 的过程。有研究发现金属铁在含有黄铁矿的中性缓冲溶液中主要将  $\text{NO}_3^-$  异化还原为  $\text{NH}_4^+$  (Liou *et al.*, 2005)。根据热力学原理, 还原性土壤中  $\text{Fe}^{2+}$  可参与  $\text{NO}_3^-$  还原为  $\text{NH}_4^+$  的化学反应, 化学反应方程为:



铁除了和  $\text{NO}_3^-$  发生反应外, 也能和  $\text{NH}_4^+$  发生反应。Chao 和 Kroontje (1966) 和李良漠等 (1988) 分别初步证明好氧或厌氧条件下无定形氧化铁与  $\text{NH}_4^+$  反应导致形成气态氮氧化物, 造成氮素损失。无定形氧化铁与  $\text{NH}_4^+$  可能存在下面的反应:



水稻土中存在大量无定形金属氧化物, 无定形铁锰氧化物在厌氧下可作为  $\text{NH}_4^+$  氧化的电子受体, 并进而导致氮素的气态损失, 这可能是稻田氮素损失的又一机制 (李良漠等, 1988), 且被认为是纯化学作用的结果。但是关于此一机制的详细反应过程, 特别是关于所形成的  $\text{NO}_3^-$  在无菌条件下又如何进行反硝化的机制仍不清楚, 有待进一步研究。

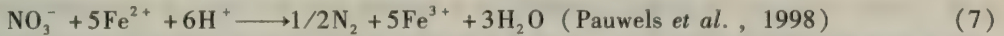
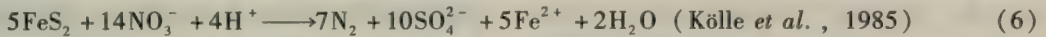
##### 5.4.2 反硝化作用与铁元素循环

目前关于厌氧条件下亚铁作为电子供体参与反硝化还原  $\text{NO}_3^-$  这一反应的认识取得了许多重要进展, 研究表明这一过程即可以是纯化学过程, 也可以是微生物介导的生物过程, 抑或是两者兼有。但似乎主要以微生物参与的反应过程为主 (Nielsen J L and Nielsen P H, 1998)。

(1)  $\text{NO}_3^-$  和 Fe 之间的化学反硝化: 大量证据表明, 厌氧条件下  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  发生化学反硝化产生  $\text{Fe}^{3+}$  和 NO, 对微生物造成毒害 (Philips *et al.*, 2003)。 $\text{Fe}^{2+}$  除了和  $\text{NO}_3^-$  发生反应外, 也能和  $\text{N}_2\text{O}$  在酸性条件下 ( $\text{pH} < 5.5$ ) 发生反应, 导致气态氮氧化物 (NO,  $\text{N}_2$ ) 的产生 (van Cleemput, 1998)。

金属铁、 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 、黄铁矿也能作为电子供体或非生物还原剂, 促进  $\text{NO}_3^-$  的化学反硝化

(Liou *et al.*, 2005), 黄铁矿、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  的氧化还原反应可用下列反应方程表示:



(2)  $\text{NO}_3^-$  和 Fe 之间的生物反硝化: 亚铁与厌氧条件下  $\text{NO}_3^-$  反硝化的反应过程主要是由微生物参与的, 即在中性 pH 厌氧环境下微生物利用  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  作为电子受体氧化  $\text{Fe}^{2+}$  成  $\text{Fe}^{3+}$ 。能够进行这一反应的微生物广泛分布于各种反硝化菌种中 (Nielsen J L and Nielsen P H, 1998), 是反硝化微生物中的重要组成成员, 约占总反硝化菌的 58% (Hauck *et al.*, 2001)。自然界中这些微生物已经从淡水江河湖沉积物中被监测、富集和鉴定出了 (Straub and Buchholz-Cleven, 1998; Kumaraswamy *et al.*, 2006)。能够进行厌氧亚铁氧化的反硝化菌主要分为两类: 光能营养型细菌 (Heising *et al.*, 1999; Hauck *et al.*, 2001) 和化能营养型反硝化微生物 (Straub *et al.*, 1996; Benz *et al.*, 1998)。在参与上述反应的化能营养型反硝化微生物中, 主要以兼性异养的微生物为主, 自养型微生物数量比兼性异养的微生物低一个数量级, 仅占其中的 2% ~ 10% (Hauck *et al.*, 2001)。

微生物介导的亚铁与  $\text{NO}_3^-$  的反硝化反应使得在厌氧的自然生态环境条件下也能完成铁的循环, 同时造成氮素损失, 因此, 自然环境下其生态功能和意义还值得深入研究。

(3) Fe 参与反硝化的机理: 有关 Fe 如何参与反硝化的过程, 已有许多研究结果, 该过程可能是微生物参与的, 也可能是纯化学过程。Komatsu 等 (1978) 认为  $\text{NO}_3^-$  首先由微生物还原为  $\text{NO}_2^-$ , 再将  $\text{NO}_2^-$  还原为 NO, 同时氧化  $\text{Fe}^{2+}$ , 这一步反应主要是化学过程。 $\text{Fe}^{2+}$  的来源主要有两种途径, 一条途径是由生物还原  $\text{Fe}^{3+}$  得到, 因为在加入  $\text{NO}_3^-$  的土壤中,  $\text{Fe}^{3+}$  的化学还原受到抑制。 $\text{Fe}^{3+}$  的生物还原是通过微生物以一种类似于硝酸盐呼吸的机理利用  $\text{Fe}^{3+}$  作为呼吸底物将其还原为  $\text{Fe}^{2+}$ 。另外一条途径是, 厌氧条件下微生物能够利用  $\text{H}_2$  作为电子供体来还原  $\text{Fe}^{3+}$  产生  $\text{Fe}^{2+}$  (Dassonville *et al.*, 2004)。

除了铁参与氮素转化和反硝化过程外, 其他金属如 Mn、Cu 也可能促进了反硝化 (Labbe *et al.*, 2003)。上述研究结果表明铁的氧化还原过程很可能是土壤中氮氧化物氧化还原反应的重要调节因子。

## 6. 土壤氮素反硝化研究中的科学问题和研究展望

世界土壤的 51% 位于热带和亚热带 (Mosier *et al.*, 2004), 然而关于反硝化的研究绝大部分工作都局限于欧、美等温带地区工业化国家, 热带、亚热带地区的研究仅占很少部分, 其中全世界亚热带地区反硝化研究占不到 20% (Hofstra and Bouwman, 2005), 而针对我国夏季湿润型亚热带地区土壤反硝化的系统研究尚属空白。我国亚热带土壤面积有 113 万  $\text{km}^2$ , 覆盖 11.8% 的国土面积, 其人口约占全国的 22.5% (赵其国等, 2000), 其中湿润亚热带耕地面积有 45 万  $\text{km}^2$ , 大约占全世界亚热带耕地面积的 4% 和我国耕地面积的 37%; 亚热带地区粮食产量、经济作物和肉类产品分别占全国总产的 44.5%, 93% 和 54.8%, 因此该地区在我国农业生产上占有重要地位 (Xu *et al.*, 2003)。亚热带地区得天独厚的气候、环境和自然资源孕育了多种成土母质, 也发展了多种多样的土地利用方式以满足对粮食、经济作物和工业原料的不断需求, 这些既是农业生产的宝贵资源, 也为我们研究土壤氮素反硝化作用提供了丰富的研究材料。

亚热带土壤为可变电荷土壤类型, 在我国南方亚热带高温多雨的气候条件下, 土壤具有高度



风化,脱硅富铝化程度高,继承性肥力较低,氧化铁、铝含量丰富 (Qafoku *et al.*, 2004),土壤酸性强,氧化势高 (Bennema *et al.*, 1970),土壤侵蚀严重导致有机碳含量低、养分贫瘠 (赵其国等, 1988) 等特点。在这样的气候环境和土壤背景条件下,加之人为土地利用和耕作管理措施,土壤氮素反硝化作用具有怎样的特点、影响因素和作用机理,其所具有的生态环境意义如何尚不十分清楚。为此,深入开展亚热带土壤反硝化作用研究具有重要的理论和实际意义。

今后对以反硝化作用为核心的厌氧条件下氮素转化研究可从以下几个方面进一步深入开展:

(1) 利用亚热带地区丰富多样的成土母质和多种利用方式等农业资源所提供的丰富研究材料,通过大样本调查采样,系统研究亚热带土壤反硝化特性,明确主要影响因素以及不同母质和利用方式对反硝化作用的影响及其作用机理。

(2) 进一步开展田间原位观测,综合考虑气候、植物生长、耕作方式等因素,深入认识亚热带土壤反硝化特性,丰富氮素循环知识。

(3) 从反硝化过程中  $N_2O$  产生和还原的角度出发,量化研究  $N_2O$  的产生和还原的相对速率,为研究反硝化产物中  $N_2O/N_2$  的比例、 $N_2O$  排放速率及其影响因素提供新的可供借鉴的研究方法和参考依据。

(4) 量化研究反硝化过程与  $CH_4$  和  $CO_2$  排放之间的关系,为评价三种温室气体—— $N_2O$ 、 $CH_4$  和  $CO_2$  的综合温室效应提供理论依据。

(5) 进一步明确反硝化产物中各种气态氮氧化物的比例和数量,明确影响反硝化产物组成的因素和机理,为制定降低有害气态氮氧化物排放和 (或) 促进反硝化向终产物  $N_2$  进行的措施提供理论依据。

(6) 进一步明确生物反硝化和化学反硝化在亚热带土壤中的相对贡献;明确 Fe 参与反硝化作用的生物学机理和 (或) 纯化学机理。

(7) 土壤通过反硝化作用可作为  $N_2O$  的汇,但土壤作为  $N_2O$  净汇的潜力有多大还不得而知。开展不同土壤以及不同生态系统作为  $N_2O$  净汇能力的研究,有助于我们正确估算排放通量、开发和制定自然减排措施。

(8) 厌氧环境条件是一种特殊的生境状态,该状态下的氮素生物地球化学循环必然有别于好氧条件下的情况。研究厌氧条件下,可发生的氮素转化过程,及其与反硝化过程的关系也将是十分有趣的研究内容。如:除反硝化作用外,厌氧铵氧化 (Anammox)、硝酸异化还原为铵 (DNRA)、厌氧条件下的非共生固氮作用等过程之间关系错综复杂,其中 Anammox 和 DNRA 也是可能的产  $N_2O$  过程 (Ma and Aelion, 2005)。深入开展这些氮素转化途径在厌氧条件下的独立和 (或) 协同过程研究,将为丰富氮素循环理论,深化氮素基础研究,综合评价厌氧条件下氮素循环的环境效应,以及氮素资源的有效开发和合理利用提供理论依据和技术支持。同时,其中某些作为反硝化的竞争过程,如微生物产铵过程,即 DNRA、微生物同化、 $NO_3^-$  激发的氮矿化 (Ma and Marjorie Aelion, 2005) 等过程,使得氮素以  $NH_4^+$  的形态保存下来,对减少  $NO_3^-$  由反硝化途径导致  $N_2O$  和  $N_2$  的气态损失,降低  $NO_3^-$  淋失、径流对地下水和地表水的污染风险和富营养化危害具有重要生态环境意义。

## 参考文献

蔡贵信,陈德立,范晓晖,等.潮土-玉米系统中氮肥的氨挥发和硝化反硝化损失 [G] //李振生,主编.挖掘生物高效利用土壤养分潜力保持土壤环境良性循环论文集 (1997—1998). 1999: 375-379.

- 曹美秋, 宋文质, 庄亚辉. 木素包衣化肥对冬麦土壤释放  $N_2O$  影响的初探 [G] // 李振生, 主编. 挖掘生物高效利用土壤养分潜力保持土壤环境良性循环论文集 (1997—1998). 1999: 301-304.
- 范晓晖. 中国农田土壤硝化反硝化潜势研究 [D]. 南京: 中国科学院南京土壤所, 1995.
- 郭荣发, 杨杰文. 成土母质和种植制度对土壤 pH 和交换性铝的影响 [J]. 生态学报, 2004, 24 (5): 984-990.
- 李长生, 肖向明, FROLKING S, 等. 中国农田的温室气体排放 [J]. 第四纪研究, 2003, 23: 493-503.
- 李良漠, 潘映华, 吴期途, 等. 无定形氧化铁作为嫌气下  $NH_4^+$  氧化时电子受体的研究 [J]. 土壤学报, 1988, 23: 184-190.
- 李亚星. 小麦土壤反硝化作用动态研究 [D]. 北京: 北京农业大学, 1993.
- 李振高, 潘映华, 伍期途, 等. 太湖地区水稻土中优势反硝化细菌的数量、组成与酶活性 [J]. 土壤学报, 1989, 26: 79-86.
- 李忠佩. 低丘红壤有机碳库的密度及变异 [J]. 土壤, 2004, 36 (3): 292-297.
- 史央, 戴传超, 陆玲. 中国科学院红壤生态站不同土壤中的微生物类群调查 [J]. 南京师大学报 (自然科学版), 2002, 25 (2): 32-37.
- 王连峰, 蔡祖聪. 水分和温度对旱地红壤硝化活力和反硝化活力的影响 [J]. 土壤, 2004, 36 (5): 543-546.
- 王效科, 李长生. 中国农业土壤  $N_2O$  排放量估算 [J]. 环境科学学报, 2000, 20 (4): 483-488.
- 颜晓元, 施书莲, 杜丽娟, 等. 包膜 N 肥的施用对水稻土  $N_2O$  排放的影响 [G] // 李振生主编. 挖掘生物高效利用土壤养分潜力保持土壤环境良性循环论文集 (1997—1998). 1999.
- 姚槐应, 何振立, 黄昌勇. 不同土地利用方式对红壤微生物多样性的影响 [J]. 水土保持学报, 2003, 17 (2): 51-54.
- 赵其国, 谢为民, 贺湘逸, 等. 江西红壤 [M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1988.
- 赵其国, 徐梦杰, 吴志东. 东南红壤丘陵地区农业可持续发展研究 [J]. 土壤学报, 2000, 37: 433-442.
- 中国农业年鉴编辑委员会. 中国农业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 166.
- 朱兆良. 农田中氮肥的损失与对策 [J]. 土壤与环境, 2000, 9 (1): 1-6.
- 邹国元, 李新慧, 张琳. 水稻土氮素硝化-反硝化损失的直接测定初报 [J]. 中国农业大学学报, 1997, 2 (增刊): 79-82.
- AGARWAL A S, SINGH B R, KANEHIRO Y. Soil nitrogen and carbon mineralization as affected by drying-rewetting cycles [J]. Soil Science Society of America Proceedings, 1971, 35: 96-100.
- AGUSTÍN M, PILAR P B, FELIPE M. Responses of soil organic matter and greenhouse gas fluxes to soil management and land use changes in a humid temperate region of southern Europe [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 917-925.
- AKIYAMA H, MCTAGGART I P, BALL B C, et al.  $N_2O$ ,  $NO$ , and  $NH_3$  emissions from soil after the application of organic fertilizers, urea and water [J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2004, 156: 113-129.
- ASTORGA V N, NOVELLA E, COMIN F A.  $N_2O$  production in freshwater wetland sediments with and without added nitrate [G] // VAN CLEEMPUT O, HOFMAN G, VERMOESEN A. Progress in Nitrogen Cycling Studies. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996: 517-522.
- AULAKH M S, DORAN J W, WALTERS DT, et al. Legume residues and soil water effects on denitrification in soils of different textures [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1991, 23: 1161-1167.
- AULAKH M S. Transformations of ammonium nitrogen in upland and flooded soils amended with crop residues [J]. Journal of Indian Society of Soil Science, 1989, 37: 248-255.
- AULAKH M S, DORAN J W, MOSIER A R. Soil denitrification-significance, measurement, and effects of management [G] // STEWART B A. Advances in Soil Science. New York: Springer-Verlag, 1992, 18: 1-57.
- AULAKH M S, RENNIE D A. Transformation of fall-applied, nitrogen-15-labeled fertilizers [J]. Soil Science Society of America Journal, 1984, 48: 1184-1189.
- AULAKH M S, RENNIE D A. Gaseous nitrogen losses from conventional and chemical summer fallow [J]. Canada Jour-



- nal of Soil Science, 1985, 65: 195-204.
- AULAKH M S, RENNIE D A, PAUL E A. Gaseous nitrogen losses from soils under zero-till as compared with conventional-till management systems [J]. Journal of Environment Quality, 1984, 13: 130-136.
- AVALAKKI U K, STRONG W M, SAGGIGNA P G. Measurement of gaseous emission from denitrification of applied nitrogen-15. II. Effects of temperature and added straw [J]. Australia Journal of Soil Research, 1995, 33: 89-99.
- AVRAHAM S, CONRAD R, BRAKER G. Effect of soil ammonium concentration on  $N_2O$  release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 5685-5692.
- BAKKEN L R. Denitrification under different cultivated plants: effect of soil moisture tension, nitrate concentration, and photosynthetic activity [J]. Biology and Fertility of Soils, 1988, 6: 271-278.
- BANDIBAS J, VERMOESEN A, DE GROOT C J, *et al.* The effect of different moisture regimes and soil characteristics on nitrous oxide emission and consumption by different soils [J]. Soil Science, 1994, 158: 106-114.
- BEAUCHAMPE E G, TREVORS J T, PAUL J W. Carbon sources for bacterial denitrification [J]. Advances in Soil Science, 1989, 10: 113-142.
- BÉDARD C, KNOWLES R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of  $CH_4$ ,  $NH_4^+$ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers [J]. Microbiological Reviews, 1989, 53: 68-84.
- BENNEMA J, JONGERIUS A, LEMOS R C. Micromorphology of some oxic and argillic horizons in south Brazil in relation to weathering sequences [J]. Geoderma, 1970, 4: 333-355.
- BENZ M, BRUNE A, SCHINK B. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemotrophic nitrate-reducing bacteria [J]. Archives of Microbiology, 1998, 169: 159-165.
- BIJAY-SINGH J, RYDEN C, WHITEHEAD D C. Some relationships between denitrification potential and fractions of organic carbon in air-dried and field-moist soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1988, 20: 737-741.
- BODEGOM P M, STAMS A J M. Effects of alternative electron acceptors and temperature on methanogenesis in rice paddy soils [J]. Chemosphere, 1999, 39: 167-182.
- BODELIER P L E, LAANBROEK H J. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47: 265-277.
- BOUWMAN A F. Analysis of global nitrous oxide emissions from terrestrial natural and agro-ecosystems [J]. Transaction of the 14th Congress of Soil Science, 1990, 2: 261-266.
- BOUWMAN A F, BOUMANS L J M, BATJES N H. Emissions of  $N_2O$  and NO from fertilized fields: summary of available measurement data [J]. Global Biogeochemical Cycling, 2002, 16 (4): 1058.
- BREMNER J M, BLACKMER A M. Terrestrial nitrification as a source of atmospheric nitrous oxide [G] // DELWICHE C C. Denitrification, Nitrification and Atmospheric  $N_2O$ . Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1981: 151-170.
- BREMNER J M, SHAW K. Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification [J]. Journal of Agriculture Science, 1958, 51: 40-52.
- CAI G X, FAN X H, ZHU Z L. Gaseous loss of nitrogen from fertilizers applied to wheat on a calcareous soil in North China Plain [J]. Pedosphere, 1998, 8: 45-52.
- CAI Z C. Nitrous oxide and dinitrogen emissions from soil under different water regimes and straw amendment [J]. Chemosphere, 2001, 42: 113-121.
- CASTRO M S, PETERJOHN W T, MELILLO J M, *et al.* Effects of nitrogen fertilization on the fluxes of  $N_2O$ ,  $CH_4$ , and  $CO_2$  from soils in a Florida slash pine plantation [J]. Canada Journal of Forest Research, 1994, 24: 9-13.
- CAVIGELLI M A, ROBERTSON G P. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33: 297-310.
- CHANTIGNY M H. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices [J]. Geoderma, 2003, 113: 357-380.

- CHAO T T, KROONTJE W. Inorganic nitrogen transformations through the oxidation and reduction of iron [J]. Soil Science Society of America Proceedings, 1966, 30: 193-196.
- CHÉNEBY D, HARTMANN A, HÉNAULT C, et al. Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce  $N_2O$  in two soils [J]. Biology and Fertility of Soils, 1998, 28: 19-26.
- CHIDTHAISONG A, CONRAD R. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 31: 73-86.
- CHO C M, MILLS J G. Kinetic formulation of the denitrification process in soil [J]. Canada Journal of Soil Science, 1979, 58: 443-457.
- CHO C M, SAKDINAN L. Mass spectrometric investigation on denitrification [J]. Canada Journal of Soil Science, 1978, 58: 443.
- COLBOURN P, HARPER I W, IQBAL M M. Denitrification losses from  $^{15}N$ -labelled calcium nitrate fertilizer in a clay soil in the field [J]. Journal of Soil Science, 1984, 35: 539.
- COMFORT S D, KELLING K A, KEENEY D R, et al. Nitrous oxide production from injected liquid dairy manure [J]. Soil Science Society of America Journal, 1990, 54: 421-427.
- CRUTZEN P J. The role of  $NO$  and  $NO_2$  in the chemistry of the troposphere [J]. Annual Review of Earth Planetary Sciences, 1979, 7: 443-472.
- DASSONVILLE F, GODON J J, RENAULT P, et al. Microbial dynamics in an anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 1417-1430.
- DAVIDSON E A, KINGERLEE W. A global inventory of nitric oxide emissions from soils [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystem, 1997, 48: 37-50.
- DELGADO J A, MOSIER A R. Mitigation alternatives to decrease nitrous oxides emissions and urea-nitrogen loss and their effect on methane flux [J]. Journal of Environment Quality, 1996, 25: 1105-1111.
- DELWICHE C C, BRYAN B A. Denitrification [J]. Annual Review of Microbiology, 1976, 30: 241-262.
- DENDOOVEN L, SPLATT P, ANDERSON J M, et al. Kinetics of the denitrification process in a soil under permanent pasture [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26: 361-370.
- DENDOOVEN L, ANDERSON J M. Maintenance of denitrification potential in pasture soil following anaerobic events [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27: 1251-1260.
- DERWENT R G. Reactive hydrocarbons and photochemical air pollution [G] // HEWITT G N. Reactive Hydrocarbons in the Atmosphere. San Diego: Academic Press, 1999: 267-291.
- DONOSO L, SANTANA R, SANHUEZA E. Seasonal variation of  $N_2O$  fluxes at a tropical savannah site: soil consumption of  $N_2O$  during the dry season [J]. Geophysical Research Letters, 1993, 20: 1379-1382.
- DORAN J W, MIELKE L N, POWER J F. Microbial activity as regulated by soil water-filled pore space [J]. Transaction of the 14th International Congress of Soil Science, 1990, 3: 94-99.
- DORLAND S, BEAUCHAMP E G. Denitrification and ammonification at low soil temperatures [J]. Canada Journal of Soil Science, 1991, 71: 293-303.
- DRURY C F, MCKENNEY D J, FINDLAY W I. Relationships between denitrification, microbial biomass and indigenous soil properties [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1991, 23: 751-755.
- DUNFIELD P F, KNOWLES R. Biological oxidation of nitric oxide in a humisol [J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 24: 294-300.
- DUXBURY J M. Factors affecting nitrous oxide production by denitrification in soils [G] // ANEJA V P. Environmental Impact of Natural Emission. Pittsburgh: Air Pollution Control Association, 1984: 82-99.
- EISENTRAEGER A, KLAG P, VANSBOTTER B, et al. Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor [J]. Water Research, 2001, 35: 2261-2267.
- ELLIS S, DENDOOVEN L, GGULDING K W T. Quantitative assessment of soil nitrate disappearance and  $N_2O$  evolution



- during denitrification: Nitrate disappearance during denitrification [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 589-595.
- FEDOROVA R I, MELEKHINA E I, ILYUCHINA N I. Evaluation of the method of "gas metabolism" for detecting extra terrestrial life: Identification of nitrogen-fixing organisms [J]. *Izvestia Akademii Nauk*, 1973, 6: 797.
- FIRESTONE M K, DAVIDSON E A. Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil [G] // ANDREA E M O, SCHIMMEL D S. *Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere*. New York: John Wiley, 1989, 7-21.
- FIRESTONE M K. Biological denitrification [G] // STEVENSON F J. *Nitrogen in Agricultural Soils*. Agronomy Monograph No. 22. Madison: American Society of Agronomy, 1982: 289-326.
- FREDRICKSON J K, KOEHLER F E, CHENG H H. Transformations of <sup>15</sup>N-labeled nitrogen in fertilizer and wheat straw in no-till soil [J]. *Agronomy Abstract of American Society of Agronomy*, 1981: 176.
- FUJIKAWA J I, HENDRY M J. Denitrification in clayey till [J]. *Journal of Hydrology*, 1991, 127: 337-348.
- GASKELL I F, BLACKMER A M, BREMNER J M. Comparison of effects of nitrate, nitrite and nitric oxide on reduction of nitrous oxide to dinitrogen by soil microorganisms [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1981, 45: 1124-1127.
- GOOSSENS A, DE VISSCHER A, BOECKX P, et al. Two-year field study on the emission of N<sub>2</sub>O from coarse and middle textured Belgian soils with different land use [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2001, 60: 23-34.
- GRUNDMANN G L, ROLSTON D E. A water function approximation to degree of anaerobiosis associated with denitrification [J]. *Soil Science*, 1987, 144: 437-441.
- HAUCK R D. Nitrogen fertilizer effects on nitrogen cycle processes [G] // CLARK F E, ROSSWALL T. *Terrestrial N Cycle*. Stockholm: Ecology Bull, 1981, 33: 551-562.
- HAUCK R D, TANJI K K. Nitrogen transfers and mass balances [G] // STEVENSON F J. *Nitrogen in Agricultural Soils*. Agronomy Monograph No. 22. Madison: American Society of Agronomy, 1982: 891-925.
- HAUCK S, BENZ M, BRUNE A, et al. Ferrous iron oxidation by denitrifying bacteria in profundal sediments of a deep lake (lake constance) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37: 127-134.
- HAYNES R J. Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 211-219.
- HEINCKE M, KAUPENJOHANN M. Effects of soil solution on the dynamics of N<sub>2</sub>O emissions: a review [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1999, 55: 133-157.
- HEISING S, SCHINK B. Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodomicrobium vannielii* strain [J]. *Microbiology*, 1998, 144: 2263-2269.
- HEISING S, RICHTER L, LUDWIG W, et al. *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a 'Geospirillum' sp. strain [J]. *Archives of Microbiology*, 1999, 172: 116.
- HOFSTRA N, BOUWMAN A F. Denitrification in agricultural soils: summarizing published data and estimating global annual rates [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2005, 72: 267-278.
- HOLTAN-HARTWIG L, DOËRSCH P, BAKKEN L R. Comparison of denitrifying communities in organic soils: kinetics of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and N<sub>2</sub>O reduction [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 833-843.
- HU H Y, GOTO N, FUJIE K. Effect of pH on the reduction of nitrite in water by metallic iron [J]. *Water Research*, 2001, 35: 2789-2793.
- HUANG C P, WANG H W, CHIU P C. Nitrate reduction by metallic iron [J]. *Water Research*, 1998, 32: 2357-2364.
- HÜTSCH B W, WEBSTER C P, POWLSON D P. Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26: 1613-1622.
- IPCC. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change

- [G] // HOUGHTON J T, DING Y, GRIGGS D J, et al. Climate Change 2001: the Scientific Basis. Cambridge: Cambridge University Press, 2001: 881.
- IQBAL M. Potential rates of denitrification in 2 field soils in southern England [J]. Journal of Agriculture Science, 1992, 118: 223-227.
- ISLAS-LIMA S, THALASSO F, GLOMEZ-HERNANDEZ J. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification [J]. Water Research, 2004, 38: 13-16.
- JAVIS, et al. Patterns of denitrification loss from grassland: effect of fertilizer inputs at different sites [J]. Plant and Soil, 1991, 131: 77-88.
- JOO H S, HIRAI M, SHODA M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Water research, 2006, 40: 3029-3036.
- JORDAN C. The effect of fertiliser type and application rate on denitrification losses from cut grassland in Northern Ireland [J]. Fertilizer Research, 1989, 19: 45-55.
- KEENEY D R, FILLERY I R, MARX G P. Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil [J]. Soil Science Society of America Journal, 1979, 43: 1124-1128.
- KEERTHISINGHE G, FRENEY J R, MOSIER A R. Effect of coated calcium carbide and nitrapyrin on nitrogen recovery and emissions of methane and nitrous oxide in dry seeded rice [J]. Biology and Fertility of Soils, 1993, 16: 71-75.
- KHALIL M I, ROSENANI A B, VAN CLEEMPUT O, et al. Nitrous oxide emissions from an ultisol of the humid tropics under maize-groundnut rotation [J]. Journal of Environmental Quality, 2002, 31: 1071.
- KLEMEDTSSON L, HANSSON G, MOSIER A. The use of acetylene for the quantification of  $N_2$  and  $N_2O$  production from biological processes in soil [G] // REVSBECH N P, SRENSEN J. Denitrification in Soil and Sediment. New York: Plenum Press, 1990: 167-180.
- KLÜBER H D, CONRAD R. Effects of nitrate, nitrite, NO and  $N_2O$  on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 25: 301-318.
- KNOWELE R. Denitrification [J]. Microbiological Reviews, 1982, 46: 43-70.
- KNOWLES R. Denitrification [G] // PAUL E A, LADD J. Soil Biochemistry. New York: Marcel Dekker, 1981, 5: 323-369.
- KNOWLES R. Denitrifiers associated with methanotrophs and their potential impact on the nitrogen cycle [J]. Ecological Engineering, 2005, 24: 441-446.
- KÖLLE W, STREBEL O, BÖTTCHER J. Formation of sulphate by microbial denitrification in a reducing aquifer [J]. Water Supply, 1985, 3: 35-40.
- KOMATSU Y, TAKAGI M, YAMAGUCHI M. Participation of iron in denitrification in waterlogged soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1978, 10: 21-26.
- KOSKINEN W C, KEENEY D R. Effect of pH on the rate of gaseous products of denitrification in a silt loam soil [J]. Soil Science Society of America Journal, 1982, 46: 1165-1167.
- KRAVCHENKO I, BOECKX P, GALCHENKO V, et al. Short and medium-term effects of  $NH_4^+$  on  $CH_4$  and  $N_2O$  fluxes in arable soils with a different texture [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34: 669-678.
- KUMARASWAMY R, SJOLLEMA K, KUENEN G, et al. Nitrate-dependent  $[Fe(II) EDTA]^{2-}$  oxidation by *Paracoccus ferrooxidans* sp. nov., isolated from a denitrifying bioreactor [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29: 276-286.
- LABBÉ N, PARENT S, VILLEMUR R. Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems [J]. Water Research, 2003, 37: 914-920.
- LIMMER A W, STEELE K W. Denitrification potentials: measurement of seasonal variation using a short-term anaerobic incubation technique [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1982, 14: 179-184.
- LION Y H, LO S L, LIN C J, et al. Chemical reduction of an unbuffered nitrate solution using catalyzed and uncata-



- lyzed nanoscale iron particles [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 127: 102-110.
- LOVLEY D R. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction [J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55: 259-287.
- LOVLEY D R, PHILLIPS E P. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53: 2636-2641.
- LUDWIG J, MEIXNER F X, VOGEL B, et al. Soil-air exchange of nitric oxide: an overview of processes, environmental factors, and modeling studies [J]. *Biogeochemistry*, 2001, 52: 225-257.
- LUO J, WHITE R E, ROGER BALL P, et al. Measuring denitrification activity in soils under pasture: optimizing conditions for the short-term denitrification enzyme assay and effects of soil storage on denitrification activity [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 409-417.
- MA H B, AELION M C. Ammonium production during microbial nitrate removal in soil microcosms from a developing marsh estuary [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37: 1869-1878.
- MALHI S S, MCGILL W B, NYBORG M. Nitrate losses in soils: effect of temperature, moisture and substrate concentration [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1990, 22: 733-737.
- MALJANEN M, MARTIKKALA M, KOPONEN H T, et al. Fluxes of nitrous oxide and nitric oxide from experimental excreta patches in boreal agricultural soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39: 914-920.
- MARIOTTI A, GERMON J C, LECLERC A. Nitrogen isotope fractionation associated with the  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  step of denitrification in soils [J]. *Canada Journal of Soil Science*, 1982, 62: 227.
- MATHIEU O, LÉVÊQUE J, HÉNAULT C, et al. Emissions and spatial variability of  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with  $^{15}\text{N}$  isotopic techniques [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 941-951.
- MENYAILO O V, STEPANOV A L, UMAROV M M. The transformation of nitrous oxide by denitrifying bacteria in Solochanks [J]. *Eurasian Soil Science*, 1997, 30: 178-181.
- MEYER M L, BLOOM P R, GRAVA J. Transformation and losses of applied nitrogen-15 labeled ammonium in a flooded organic soil [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1989, 53: 79.
- MOSIER A, WASSMANN R, VERCHOT L, et al. Methane and nitrogen oxide fluxes in tropical agricultural soils: sources, sinks and mechanisms [J]. *Environment, Development and Sustainability*, 2004, 6: 11-49.
- MULLER M M, SUNDMAN V, SKUJINS J J. Denitrification in low pH spodosols and peats determined with the acetylene inhibition method [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 40: 235-239.
- MURRAY R E, KNOWLES R. Production of  $\text{NO}$  and  $\text{N}_2\text{O}$  in the presence and absence of  $\text{C}_2\text{H}_2$  by soil slurries and batch cultures of denitrifying bacteria [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 1115-1122.
- MYROLD D D, TIEDJE J M. Establishment of denitrification capacity in soil: effects of carbon, nitrate and moistures [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1985, 17: 819-822.
- MYROLD D D, TIEDJE J M. Simultaneous estimation of several nitrogen cycle rates using  $^{15}\text{N}$ : theory and application [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1986, 18: 559.
- NEISBIT S P, BREITENBECK G A. A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils [J]. *Agricultural Ecosystem Environment*, 1992, 41: 39-54.
- NIELSEN J L, NIELSEN P H. Microbial nitrate-dependent oxidation of ferrous iron in activated sludge [J]. *Environment Science and Technology*, 1998, 32: 3556-3561.
- NIELSEN T, KJÜLLER A, STRUWE S. Potential denitrification and  $\text{N}_2\text{O}$  formation in dry European coniferous forest soils [J]. *Forest Ecology and Management*, 1994, 68: 101-106.
- OKEREKE G U. Growth yield of denitrifiers using nitrous oxide as a terminal electron acceptor [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1993, 9: 59-62.
- OTTLEY C J, DAVISON W, EDMUNDS W M. Chemical catalysis of nitrate reduction by iron (II) [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1997, 61: 1819-1828.

- PANDEY A, PALNIL M S. The rhizosphere effect of tea on soil microbes in a Himalayan monsoonal location [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 21 (3): 131-137.
- PARKIN T B, SEXSTONE A L, TIEDJE J M. Adaptation of denitrifying populations to low soil pH [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49: 1053-1056.
- PARKIN T B, STARR J L, MEISINGER I J. Influence of sample size on measurement of soil denitrification [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1987, 51: 1492-1501.
- PAUWELS H. Natural denitrification in groundwater in the presence of pyrite: preliminary results obtained at Naizin (Brittany, France) [J]. *Mineral Magazine*, 1994, 58: 696-697.
- PAUWELS H, FOUCHER J C, KLOPPMANN W. Denitrification and mixing in a schist aquifer: influence on water chemistry and isotopes [J]. *Chemical Geology*, 2000, 168: 307-324.
- PAUWELS H, KLOPPMANN W, FOUCHER J C, et al. Field tracer test for denitrification in a pyrite-bearing schist aquifer [J]. *Applied Geochemistry*, 1998, 13: 767-778.
- PAYNE W J. The status of nitric oxide and nitrous oxide as intermediates in denitrification [G] // DELWICHE C C. *Denitrification, Nitrification, and Atmospheric Nitrous Oxide*. New York: Wiley-Interscience, 1981: 85-103.
- PHILIPS S, RABAIEY K, VERSTRAETE W. Impact of iron salts on activated sludge and interaction with nitrite or nitrate [J]. *Bioresource Technology*, 2003, 88: 229-239.
- PRIEME A, BRAKER G, TIEDJE J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested uplands and wetland soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 1893-1924.
- PU G X, SAFFIGNA P G, XU Z H. Denitrification, leaching and immobilisation of  $^{15}\text{N}$ -labelled nitrate in winter under windrowed harvesting residues in hoop pine plantations of 1~3 years old in subtropical Australia [J]. *Forest Ecology and Management*, 2001, 152: 183-194.
- QAFOKU N P, VAN RANST E, NOBLE A, et al. Variable charge soils: their mineralogy, chemistry and management [J]. *Advances in Agronomy*, 2004, 84: 159-215.
- REDDY K R, RAO P S C, JESSUO R E. The effect of carbon mineralization on denitrification kinetics in mineral and organic and organic soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1982, 46: 62-68.
- RICE C W, SMITH M S. Denitrification in no-till and plowed soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1984, 46: 1168-1173.
- RICH J J, MYROLD D D. Community composition and activities of denitrifying bacteria from adjacent agricultural soil, riparian soil, and creek sediment in Oregon, USA [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36: 1431-1441.
- RICH J J, HEICHEN R S, BOTTOMLEY P J, et al. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 5974-5982.
- ROBERTSON G P. *Agricultural Ecosystem Effects on Trace Gases and Global Climate Change* [M]. Madison: American Society of Agronomy, 1993: 95-108.
- ROBERTSON G P, PAUL E A, HARWOOD R R. Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere [J]. *Science*, 2000, 289: 1922-1925.
- ROLSTON D E, SHARPLEY A N, TOY D W, et al. Field measurement of denitrification: III. Rates during irrigation cycles [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1982, 46: 289-296.
- ROLSTON D E, HOFFMAN D L, TOY D W. Field measurement of denitrification. I. Flux of  $\text{N}_2$  and  $\text{N}_2\text{O}$  [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1978, 42: 863-869.
- ROSENKRANZ P, BRÜGGEMANN N, PAPEN H, et al.  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$  and  $\text{CH}_4$  exchange, and microbial N turnover over a Mediterranean pine forest soil [J]. *Biogeosciences Discussions*, 2005, 2: 673-702.
- ROY R, CONRAD R. Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in anoxic ricefield soil [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28: 49-61.
- RUDOLPH J, FRENZEL P, PFENNIG N. Acetylene inhibition technique underestimates *in situ* denitrification rates in



- intactcores of freshwater sediment [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1991, 85: 101-106.
- RYDEN G C. Denitrification loss from a grassland soil in the field receiving different rates of nitrogen as ammonium nitrate [J]. Journal of Soil Science, 1983, 34: 355-365.
- SAHRAWAT K L. Is nitrate reduced to ammonium in waterlogged acid sulfate soil? [J]. Plant and Soil, 1980, 57: 147-149.
- SAVANT N K, MCCLELLAN G H. Do iron oxide systems influence soils under wetland rice based cropping systems? [J]. Communication in Soil Science. Plant Analysis, 1987, 18: 83-113.
- SCHIMEL J P, HOLLAND E A, VALENTINE D. Controls on methane flux from terrestrial ecosystem [G] // HARPER L A, et al. Agricultural Ecosystem Effects on Trace Gases and Global Climate Change. Madison: American Society of Agronomy, 1993: 167-182.
- SCHROEDER E D. Denitrification in waste water management [G] // DELWICHE C C. Denitrification, Nitrification, and Atmospheric Nitrous Oxide. New York: Wiley, 1981: 105-125.
- SIEGEL R S, HAUCK R D, KURZ L T. Determination of  $^{30}\text{N}_2$  and application of measurement of  $\text{N}_2$  evolution during denitrification [J]. Soil Science Society of America Journal, 1982, 46: 68.
- ŠIMEK M, ELHOTTOVÁ D, KLIMEŠ F, et al. Emissions of  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$ , denitrification measurements and soil properties in red clover and ryegrass stands [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 9-21.
- SØRENSEN J, THORLING L. Stimulation by lepidocrocite ( $7\text{-FeOOH}$ ) of  $\text{Fe}(\text{II})$ -dependent nitrite reduction [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1991, 55: 1289-1294.
- STALEY T E, CASKEY W H, BOYER D G. Soil denitrification and nitrification potentials during the growing season relative to tillage [J]. Soil Science Society of America Journal, 1990, 54: 1602-1607.
- STEPHANIE A B, JEREMY J R, PETER J B, et al. Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the cascade mountains of Oregon [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38: 870-878.
- STEVENS R J, LAUGHLIN R J, MALONE J P. Soil pH affects the processes reducing nitrate to nitrous oxide and di-nitrogen [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30: 1119-1126.
- STEVENSON F J. Origin and distribution of nitrogen in soil [G] // STEVENSON F J. Nitrogen in Agricultural Soils. Agronomy Monograph No. 22. Madison: American Society of Agronomy, 1982: 1-42.
- STRAUB K L, BUCHHOLZ-CLEVEN B E E. Enumeration and detection of anaerobic ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 4846-4856.
- STRAUB K L, BENZ M, SCHINK B, et al. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 1458-1460.
- STRES B, MAHNE I, AUGUŠTIN G, et al. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 301-309.
- STRUWE S, KJØLLER A. Potential for  $\text{N}_2\text{O}$  production from beech (*Fagus sylvaticus*) forest soils with varying pH [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26: 1003-1009.
- SVENSSON B H, KLEMEDTSSON L, ROSSWALL T. Preliminary field denitrification studies of nitrate-fertilized and nitrogen-fixing crops [G] // GOLTERMAN E L. Denitrification in the Nitrogen Cycle. NATO Conference Series I: Ecology. New York: Plenum Press, 1985: 9.
- SVENSSON B, et al. Soil denitrification in three cropping systems characterized by differences in nitrogen and carbon supply. I. Rate-distribution frequencies, comparison between systems and seasonal N losses [J]. Plant and Soil, 1991, 138: 257-271.
- VAN CLEEMPOT O. Subsoils: chemo- and biological denitrification,  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emission [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1998, 52: 187-194.

- VAN DE GRAFF A A, MULDER A, DE BRUIJN P, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 1246-1251.
- VERDEGEM L, BAERT L. Losses of nitrate nitrogen in sandy and clayey soils—A qualitative and quantitative approach to the chemical  $\text{NO}_3^-$ -N reduction in reduced subsoils [J]. *Pedologie*, 1985, XXXV-1: 39-54.
- VINTHER F. Temperature and Denitrification. Danish Report No. A93 [M]. Copenhagen: National Agency of Environmental Protection, 1990.
- VITOUSEK P M, ABER J D, HOWARTH R W, et al. Human alterations of the global nitrogen cycle: sources and consequences [J]. *Ecological Applications*, 1997, 7: 737-750.
- WANG Z P, DELAUNE R D, LINDAU C W, et al. Methane production from anaerobic soil amended with rice straw and nitrogen fertilizers [J]. *Fertilizer Research*, 1992, 33: 115-121.
- WATSON R T, MEIRA FILHO L G, SANHUEZA E. Sources and sinks [G] // HOUGHTON J T, CALLANDER B A, VARNEY S K. *Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992: 25-46.
- WDCGG. World Data Center for Greenhouse Gases. WMO Global Atmospheric Watch. <http://gaw.kishou.go.jp/wdogg.html>. 2004.
- WEIER K L, DORAN J W, POWER J F, et al. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ration as affected by soil water, available carbon, and nitrate [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, 57: 66-72.
- WEIER K L, GILLIAM J W. Effect of acidity on denitrification and nitrous oxide evolution from Atlantic coastal-plain soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1986, 50: 1202-1205.
- WELL R, HÖPER H, MEHRANFAR O, et al. Denitrification in the saturated zone of hydromorphic soils-laboratory measurement, regulating factors and stochastic modeling [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37: 1822-1836.
- WHEATLEY R E, GRIFFITHS B S, RITZ K. Variation in the rates of nitrification and denitrification during the growth of potatoes in soil with different carbon inputs and the effect of these inputs on soil nitrogen and plant yield [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1991, 11: 157-162.
- WOLF I, RUSSOW R. Different pathways of formation of  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  and NO in black earth soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 229-239.
- WRAGE N, VELTHOF G L, OENEMA O, et al. Acetylene and oxygen as inhibitors of nitrous oxide production in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira briensis*: a cautionary tale [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47: 13-18.
- WZODARCZYK T, ST EPNIEWSKI W, BRZEZINSKA M. Nitrous oxide production and consumption in Calcaric Regosols as related to soil redox and texture [J]. *International Agrophysics*, 2005, 19: 263-271.
- XING G X, ZHU Z L. A primary analysis and estimation of nitrogen sources and sinks in China watershed [G] // 李振生主编. 挖掘生物高效利用土壤养分潜力保持土壤环境良性循环论文集 (1997—1998). 1999: 357-362.
- XU R K, ZHAO A Z, LI Q M, et al. Acidity regime of the red soils in a subtropical region of southern China under field conditions [J]. *Geoderma*, 2003, 115: 75-84.
- XU Y B, CAI Z C. Denitrification characteristics of subtropical soils in China affected by soil parent material and land use [J]. *European Journal of Soil Science*, 2007, 58: 1293-1303.
- YAMANE I, OKAZAKI M. Chemical properties of submerged rice soils [J]. *Transactions of the 12th International Congress of Soil Science*, 1982: 143-157.
- YAMULKI S, GOULDING K W T, WEBSTER C P, et al. Studies on NO and  $\text{N}_2\text{O}$  fluxes from a wheat field [J]. *Atmospheric Environment*, 1995, 29: 1627-1635.
- YAN X Y, CAI Z C. Laboratory study of methane oxidation in paddy soils [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1997, 49: 105-109.
- YEOMANS J C, BEAUCHAMP E G. Sulfur in acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by soil microorganisms [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1982, 46: 75-77.



- YOSHINARI T, HYNES R, KNOWLES R. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1977, 9: 177-183.
- ZHAO Q G. Material Cycling and Regulation in Red Soils of China [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- ZHU Z L. Nitrogen balance and cycling in agroecosystems of China [G] // ZHU Z L, WEN Q X, FRENEY J R. Nitrogen in Soil of China. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997: 323-330.
- ZUMFT W G, VIEBROCK-SAMBALE A, BRAUN C. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1990, 192: 591-599.
- ZUMFT W G. The denitrifying prokaryotes [G] // DWORKIN M. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. New York: Springer, 1999.

# 群落及生态系统生态学

---

Population Ecology, Community and Ecosystem Ecology





# 新疆高盐环境可培养嗜盐放线菌多样性研究

耿晓阳 唐蜀昆 徐丽华 李文均\*

(云南大学云南省微生物研究所教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650091)

## A Study on Biodiversity of Halophilic Actinobacteria in Hypersaline Environments

Zhi Xiao-yang Tang Shu-kun Xu Li-hua Li Wen-jun\*

(Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**摘 要** 放线菌是一类高 G + C 含量的革兰氏阳性细菌, 目前是细菌域中的一个门, 因产生多种多样的生物活性物质而备受人们关注。放线菌在土壤环境中分布较广, 相关的生态学、系统分类和代谢产物活性研究也较多。但是, 在高盐极端环境中放线菌的相关研究则较少。由于较强的环境选择压力, 高盐环境中的放线菌群落组成可能和普通环境不同, 对于发现新的放线菌资源、新的活性产物将是一个新的契机。新疆是我国的盐湖主要分布区之一, 也是高盐环境微生物资源研究的热点。通过对新疆盐湖环境放线菌分离方法的深入研究, 我们得到了大量的嗜盐及耐盐的放线菌资源, 其中包括大批的放线菌新物种。这些资源为了解新疆高盐环境可培养放线菌的多样性, 提供了最直接的依据。同时, 也为开展嗜盐放线菌的生理学、微生物生物地理学等其他研究积累了良好的素材。

**关键词** 高盐环境; 嗜盐放线菌; 分离; 多样性; 分子生态; 系统学

**Abstract** Actinobacteria is a group of Gram-positive bacteria with high G + C content, and constitutes a phylum in domain Bacteria. Actinobacteria was paid more attention by scientists because of its various bio-active substances. In the soil environment, Actinobacteria has widely distribution, and so many investigators had been engaged in its ecology, systematic taxonomy and metabolic substances research. However, Actinobacteria distributed in hypersaline environments has not obtained much attention. Due to the intense

基金项目: 国家 973 项目 (2004CB719601), 国家自然科学基金 (30600001), 教育部新世纪优秀人才支持计划, 云南省中青年学术和技术带头人后备人才基金, 云南省自然科学基金 (2007C167M) 共同资助。

\* 通讯作者: Tel/Fax: +86 - 871 - 5033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liaact@hotmail.com



environment selective press, the community structure of Actinobacteria in hypersaline environment might be different from that of Actinobacteria in normal habitats. This will be an opportunity or a challenge for discovering new resources of Actinobacteria and novel bioactive products. Xinjiang is one main distributed region of the salt lakes in China and is also an important research location for microbial resources in hypersaline environments. On the basis of the comprehensive study of isolation methods, abundant microbial resources, which contained many novel actinobacteria taxa, were obtained. These resources provided evidence for understanding the biodiversity of actinobacteria in Xinjiang hypersaline environment. In addition, these resources become perfect materials for the study of microbial physiology and biogeography.

**Key words** hypersaline environments; halophilic Actinobacteria; isolation; diversity; molecular ecology; systematics

## 1. 前言

放线菌是指 DNA 的 G + C 含量在 50 mol% 以上的革兰氏阳性细菌, 它们的 16S rRNA 在系统发育上密切相关, 既包括具有细菌形态的放线细菌, 又包括传统意义上的菌丝较为丰富的经典放线菌 (职晓阳等, 2006)。放线菌的分类地位经过了复杂的演变: 1875 年 Cohn 最早发现了放线菌, 由于大多数放线菌具有良好的菌丝体, 19 世纪前人们曾将其归入真菌中; 随着科学的发展和新技术的应用, 人们的认识逐渐深入, 才将放线菌列于细菌中; 1968 年 Murray 将放线菌归入原核生物界厚壁菌门; 1986 年出版的《伯杰氏系统细菌学手册》中, 放线菌被划分在原核生物界, 厚壁菌门, 分枝菌纲, 放线菌目; Stackebrandt 等 (1997) 通过对 16S rRNA 基因序列分析, 提出了放线细菌纲这一分类等级。此时的放线细菌纲既包括产菌丝的典型放线菌, 又包括细菌形态的放线细菌; 2001 年出版的《伯杰氏系统细菌学手册》第二版把高 G + C 含量革兰氏阳性细菌确定为放线菌门 (Phylum Actinobacteria) (Boone *et al.*, 2001)。有关放线菌的《伯杰氏系统细菌学手册》第二版第四卷将于 2009 年出版。

极端微生物 (extremophiles) 一词最早由 MacElroy 于 1974 年提出的, 它是一类生长在被认为是生命禁区的极端环境中的微生物类群。近十多年来, 极端环境 (包括极端高、低温, 极端高酸、高碱、高盐、高渗透压, 高辐射等) 微生物的研究受到广泛的重视。尤其在以下几个方面: ① 极端环境微生物是研究生物进化、生命起源和生物适应机制的理想材料。早在 1987 年, Woese 根据对高温嗜盐菌分子生物学研究的结果, 提出了不同于真细菌, 也不同于真核生物的第三类生物 “古菌” (Archaeobacteria) 的概念, 从而大大推动了生物进化的研究 (Woese, 1987)。② 极端微生物为了适应所栖息的极端环境, 其生长特性, 营养需求, 繁殖规律, 细胞结构, 膜结构, 蛋白及酶的结构, 核酸结构, 基因表达、调控、修复, 均与正常环境中的微生物有很大的不同。这些都是生物进化中的大问题。③ 由于适应极端环境的结果, 极端微生物必然具有特殊的代谢类型, 并产生特殊的极其多样化的代谢产物, 这些代谢类型和代谢产物又完全可以被人类利用。④ 可以从极端微生物中寻找特殊基因, 将其转植到其他生物, 产生目的产物或性状。⑤ 目前所知道的微生物资源的种类不过占实有总数的 1% ~ 10%, 有人认为不到 0.1%。极端环境的微生物资源更是知之甚少。因此, 极端环境是发现未知微生物资源的理想之地。⑥ 许多天然环境的不合理开发不但使其原貌遭到破坏, 而且那里的微生物资源也面临毁灭, 因此极端环境微生物资源的研究开发具有紧迫性。

对于极端环境中的放线菌资源研究, 目前欧、美、日及我国基本上处于同一起跑线上。相对而言, 英国 Newcastle 大学的 Goodfellow 实验室、Liverpool 大学 Edwards 实验室在嗜热放线菌生理

学、生态学、分类学、遗传学及其相关生物技术研究方面较为突出；日本、德国学者在嗜碱、嗜冷放线菌的生理学、生态学、分类学及其酶学研究方面较为深入；美国的 Williams 教授在嗜酸放线菌生态学、生理学等方面的研究起步较早。在极端环境放线菌资源的开发利用方面，早在 20 世纪 80 年代初期，我国学者，尤其是我们云南大学省微生物研究所的研究人员就开始了较为系统地云南全省及新疆、青海部分地区的高温、低温、酸碱及高盐环境中的放线菌资源研究。

新疆，东西全长 1 900 km，南北宽 1 500 km，面积  $1.6468 \times 10^6 \text{ km}^2$ ，占全国总面积的 1/6，是我国面积最大的省区。同时也是盐碱化比较严重的地区，气候特征和用水不当是土壤盐碱化的主要原因。新疆的大小 200 个湖泊中就有 101 个 (50.5%) 盐湖，占湖泊面积的 75.1% (郑喜玉等, 1995)，也是我国面积最大的盐湖成盐区。对新疆高盐环境微生物的研究，长期以来人们主要集中在嗜盐古菌和嗜盐细菌，几乎没有有关嗜盐放线菌研究的报道。由于高盐环境放线菌研究领域多年以来，无论是纯培养还是免培养都鲜有关于嗜盐放线菌的报道，在研究理论和方法上没有大的发展，对高盐环境放线菌的群落组成、多样性和地理分布基本不清楚。

盐环境放线菌营养生理学的初步研究 (Tang *et al.*, 2003) 为改进盐环境放线菌的分离方法提供了理论指导。通过不断的改进分离方法，使得客观地认识嗜盐放线菌和高盐环境各种环境因子的关系及其对营养物质的特殊需求，建立适合嗜盐放线菌的纯培养成为可能，进而，为揭示新疆高盐环境放线菌的群落组成、生物多样性、地理分布，为嗜盐放线菌的深入研究和开发利用提供理论依据和菌种资源保障。

本研究主要着眼于新疆艾丁湖、艾比湖、北沙窝湖、巴里坤干盐湖、赛里木湖、甘加湖，以及和硕地区盐碱土、拜城盐场的高盐土壤样品中的可培养放线菌多样性。经过不断的改进分离培养的方法，初步揭示了新疆高盐环境可培养放线菌的群落组成与结构。

## 2. 新疆高盐环境主要放线菌类群

近年来，我们通过研究适合于新疆盐湖、盐碱地等高盐环境放线菌的分离方法，得到了大批的菌种资源；发现新疆高盐环境中的放线菌群落组成明显区别于普通环境，它们主要分布于放线菌目，假诺卡氏菌科和拟诺卡氏菌科的 7 个属，且它们的分布区域有所不同。现将我们研究的部分结果报告如下：

### 2.1 拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)

拟诺卡氏菌属是一类广泛分布的高 G + C 含量革兰氏阳性好氧菌，隶属于放线菌目，链孢囊菌亚目，拟诺卡氏菌科。该属最早由 Meyer (1976) 有效描述，目前共有 24 个有效发表种 (Li *et al.*, 2006)。基于其有效描述种的 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树见图 1，其中，标注为黑体的为本室所发表的有效种。拟诺卡氏菌在各种环境中广泛分布 (Kroppenstedt & Evtushenko, 2006)，尤其在中度和高度盐环境中表现出了优势菌群的特征 (Tang *et al.*, 2003)。分布于盐环境的该属菌株多为耐盐菌，即在无盐的培养条件下也能生长。其中 *Nocardiopsis halophila* (Al-Tai & Ruan, 1994) (最适盐浓度为 10%)，*Nocardiopsis kunsanensis* (Chun *et al.*, 2000) (最适盐浓度为 10%) 及我室发表的 *Nocardiopsis xinjiangensis* (Li M G *et al.*, 2003) (最适盐浓度为 15%) 和 *Nocardiopsis salina* (Li W J *et al.*, 2004) (最适盐浓度为 10%) 共 4 个种为嗜盐放线菌，*Nocardiopsis lucentensis* (Yassin *et al.*, 1993) 为轻度嗜盐放线菌 (最适盐浓度为 5% ~ 10%)。对于盐的耐受性上，该属菌株呈现了多样性。

通过对分离培养基研究，发现营养较为丰富的分离培养基 (例如：改良 ISP 5) 能够分离到



大批的拟诺卡氏菌。所以此类培养基能够选择性地分离拟诺卡氏菌，但同时存在着分离到的放线菌类群单一，且多为耐盐拟诺卡氏菌的问题。当然，能够尽可能多的分离到拟诺卡氏菌，对该属的系统分类学、生理学和生态学的研究等都是有帮助作用的。只是目前在属以下分类单元的菌株去除重复还缺乏比较有效、快捷的方法。

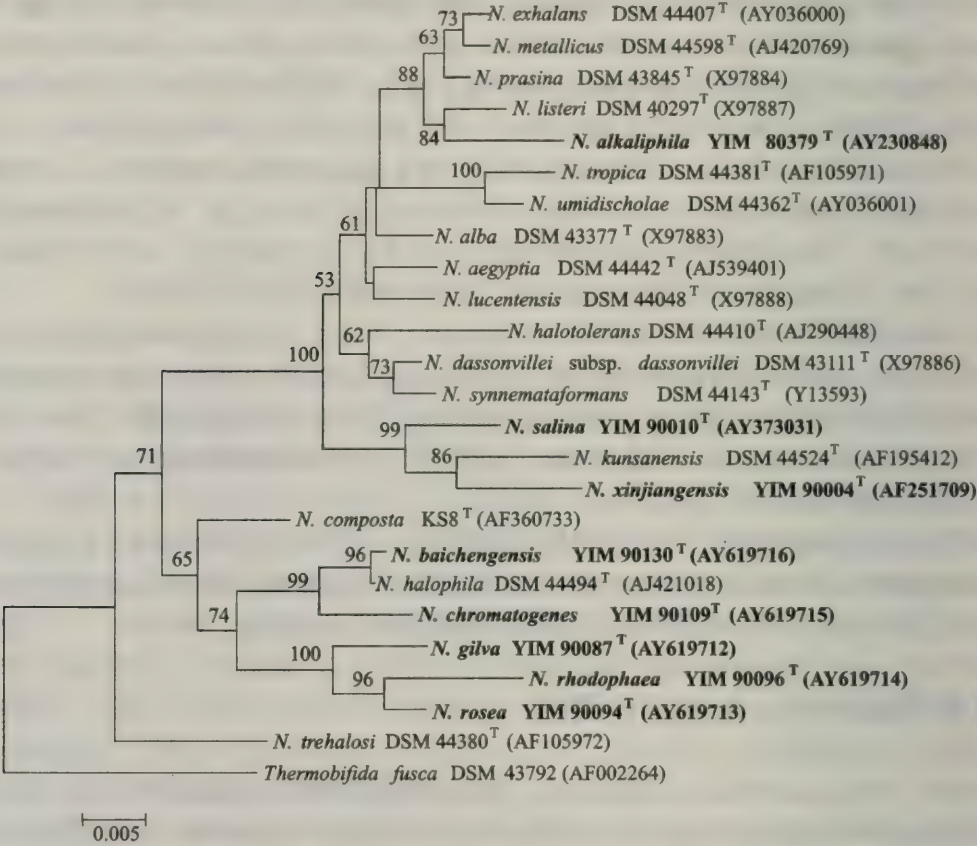


图 1 基于拟诺卡氏菌属有效描述种的 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of 24 validly described *Nocardiopsis* species.

Bootstrap values ( > 50% ) from 1 000 analyses are shown at the nodes of the tree. Bar, 5 nucleotide substitutions per 1 000 nucleotides.

2.2 链单孢菌属 (*Streptomonospora*)

链单孢菌属由我室于 2001 年首次描述 (Cui *et al.*, 2001)。该属目前仅在新疆盐湖环境中被分离，可能是我国盐湖环境的特有类群。另外，链单孢菌也是除放线多孢菌属外第二个被有效描述的严格嗜盐放线菌，即目前有效描述种和分离株都为嗜盐菌。链单孢菌属与拟诺卡氏菌属同属于拟诺卡氏菌科，有效描述种 2 个：*Streptomonospora salina* (Cui *et al.*, 2001) 和 *Streptomonospora alba* (Li *et al.*, 2003a)。通过改良分离方法，降低拟诺卡氏菌的出菌率后，我室分离到了大量的链单孢菌，且在新疆艾丁盐湖及其他盐湖中广泛分布。因此，链单孢菌可能是除拟诺卡氏菌外的第二个新疆盐湖环境的优势菌群。从系统发育关系上，链单孢菌属和拟诺卡氏菌属有着非常相近的亲缘关系。

起初，分布于新疆盐湖环境的链单孢菌属的物种多样性比较低，目前仅有 2 个有效描述种，而且 16S rRNA 基因序列相似性为 99.3% (Li *et al.*, 2003a)。近期的研究发现，在链单孢菌属中可能同样存在着比较丰富的物种多样性。新近分离到的链单孢菌菌株 YIM 91355 与 *S. salina* 和

*S. alba* 的 16S rRNA 基因序列相似性都低于 97% (待发表)。如图 2 所示, 新疆艾丁湖高盐环境链单孢菌类群明显分为 3 个大的进化分支, 其中包括了为数较多的潜在新物种, 同时也显示在该地区具有丰富的链单孢菌资源。

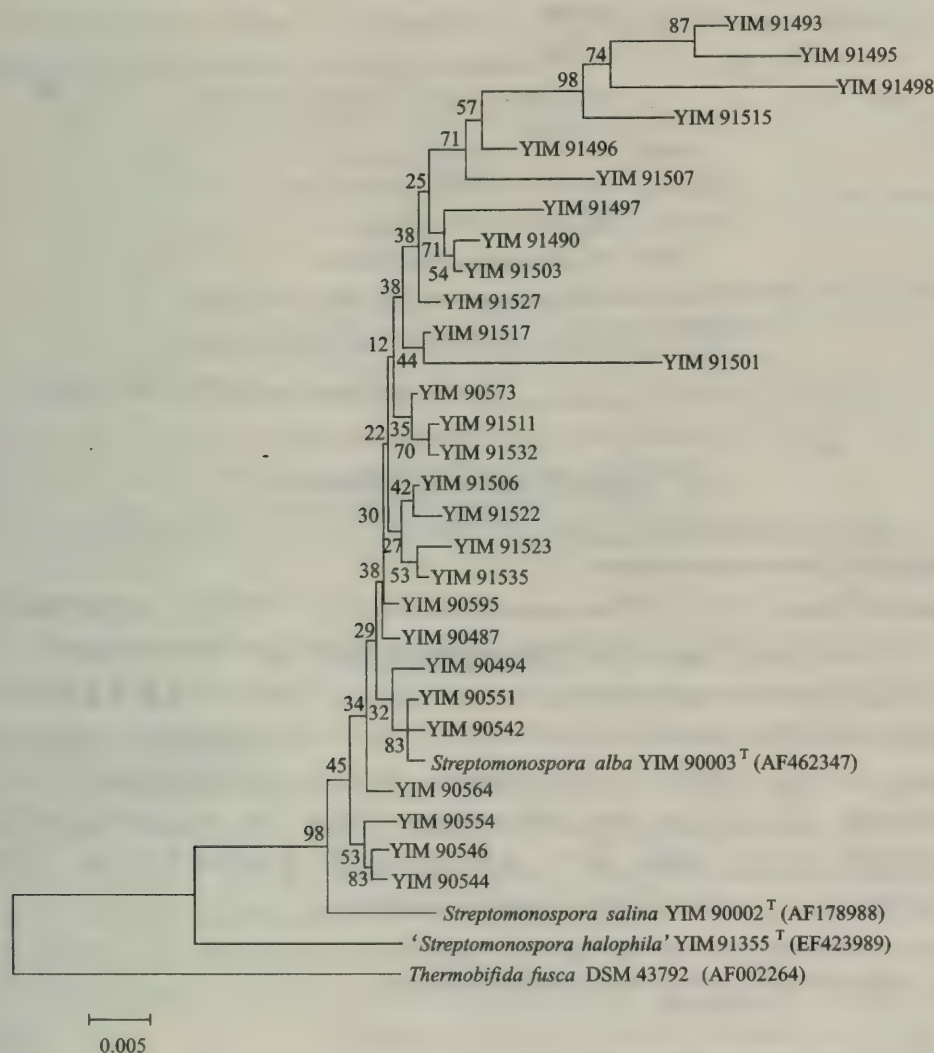


图 2 新疆盐湖环境链单孢菌的物种多样性

Fig. 2 Species diversity of the genus *Streptomonospora* in salt lakes in Xinjiang, China

### 2.3 放线多孢菌属 (*Actinopolyspora*)

放线多孢菌属是最早被描述的高盐环境放线菌类群 (Gochner et al., 1975), 从此掀起了高盐极端环境放线菌的研究。它也是第一个严格嗜盐放线菌, 最适生长盐浓度是 15% ~ 20%, 能在 30% 的食盐中生长, 在低于 5% 的 NaCl 中不生长。放线多孢菌属隶属于放线菌目, 假诺卡氏菌亚目, 假诺卡氏菌科。目前有效描述种 3 个: *Actinopolyspora halophila* (Gochner et al., 1975)、*Actinopolyspora iraqiensis* (Ruan et al., 1994) 和 *Actinopolyspora mortivallis* (Yoshida et al., 1991)。有趣的是该属是 Gochner 等在研究红皮盐杆菌 (*Halobacterium cutirubrum*) 类脂的过程中无意中发现的。上述三个放线多孢菌有效描述种都分离自国外的盐环境样品中, 分布于我国高盐环境的放线多孢菌之前还没有相关报道。通过对新疆盐湖环境的放线菌分离培养, 我室首次从



和硕盐碱土和拜城盐城发现了大量放线多孢菌,而且还可能存在着较高的物种多样性(图3)。同时,研究发现 *Actinopolyspora iraqiensis* 的分离地位也存在问题,相关数据即将发表。

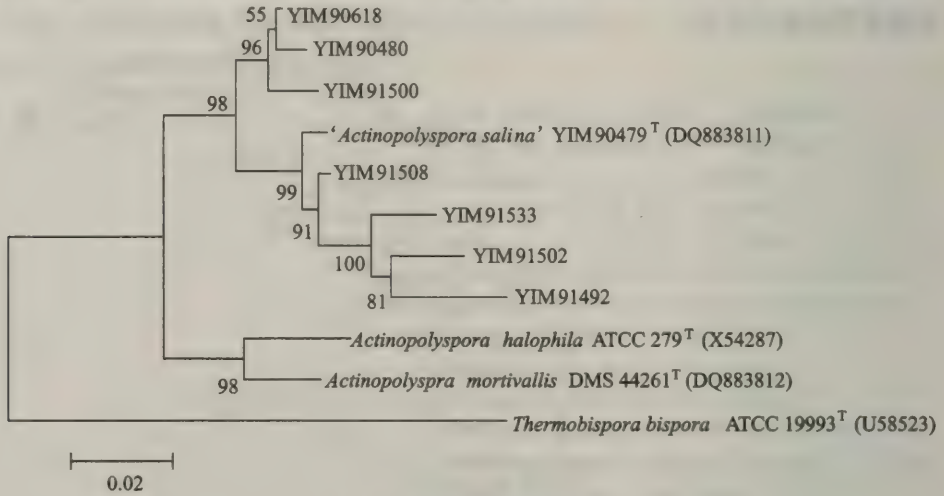


图3 新疆盐湖环境放线多孢菌的物种多样性

Fig. 3 Species diversity of the genus *Actinopolyspora* in salt lakes in Xinjiang, China

#### 2.4 糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*)

Nonomura 和 Ohara (1971) 对 *Thermoactinomyces viridis* 进行了再分类,建立了糖单孢菌属,并描述了 *Saccharomonospora viridis*。糖单孢菌属与放线多孢菌属同属于假诺卡氏菌科,目前有效种7个。其中, *Saccharomonospora halophila* (Al-Zarban *et al.*, 2002) 是该属首次被描述的嗜盐菌,紧接着我室从新疆盐湖环境中分离并有效描述了第二个嗜盐糖单孢菌, *Saccharomonospora paurometabolica* (Li *et al.*, 2003b)。随着研究的深入,我们发现在新疆盐湖环境中不仅广泛分布着大量的糖单孢菌,而且基于16S rRNA基因序列构建的系统进化树,嗜盐菌和普通环境的糖单孢菌分开并形成独立的分支(图4)。另外,分离自新疆的嗜盐糖单孢菌在进化树上也形成独立的分支,似乎我们可以从中得出系统发育与地理分布的相关性。

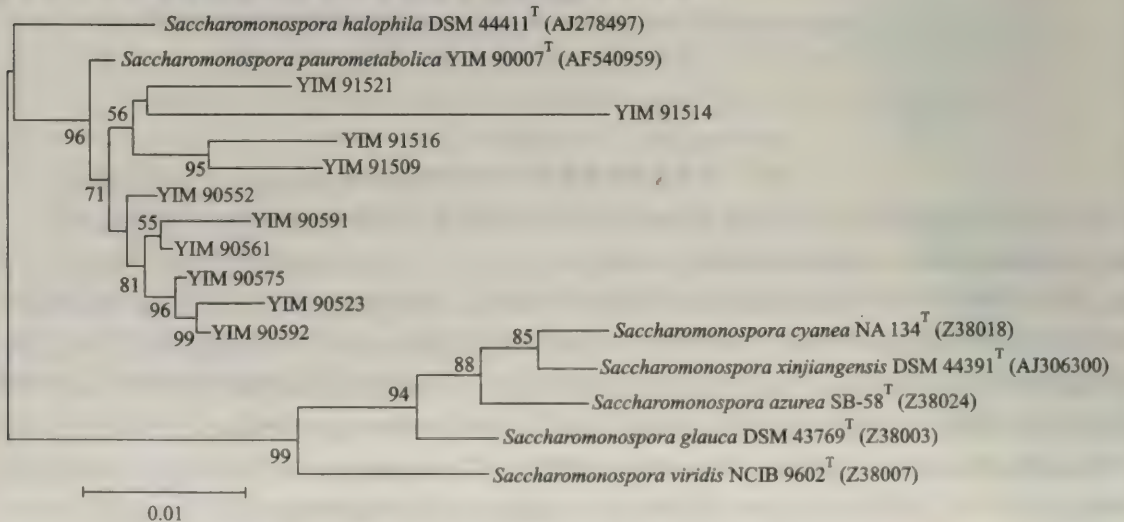


图4 新疆盐湖环境糖单孢菌的物种多样性

Fig. 4 Species diversity of the genus *Saccharomonospora* in salt lakes in Xinjiang, China

## 2.5 糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)

糖多孢菌属由 Lacey 等 1975 年建立, 同样隶属于假诺卡氏菌科, 目前包括 10 个有效描述种, 全为普通环境微生物。我室首次从新疆盐湖环境中分离到了两个潜在的糖多孢菌新种 (待发表): '*Saccharopolyspora halophila*' YIM 90500<sup>T</sup> 和 '*Saccharopolyspora salina*' YIM 91168<sup>T</sup> (图 5)。但其分布范围较窄, 目前只在艾丁湖湖边地区被发现。

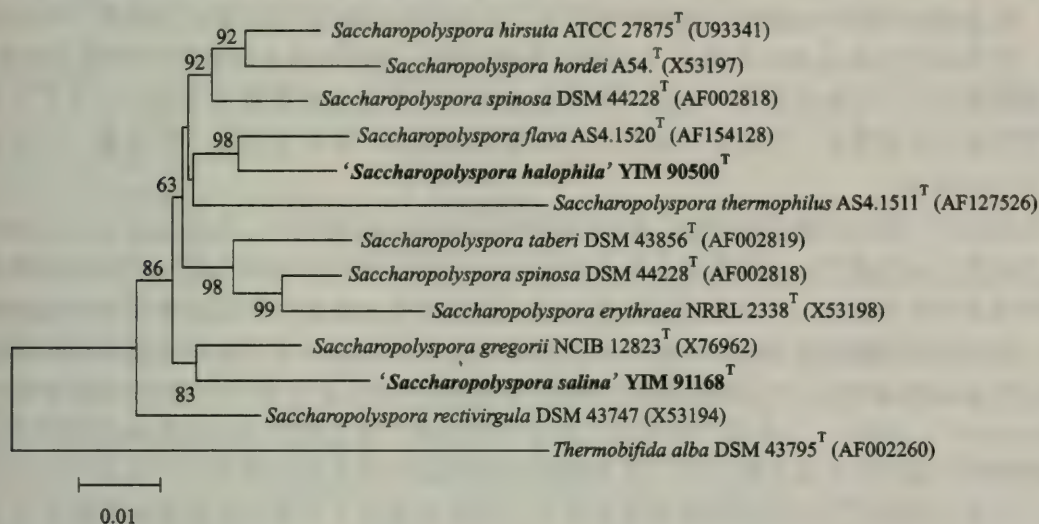


图 5 新疆盐湖环境糖多孢菌的物种多样性

Fig. 5 Species diversity of the genus *Saccharopolyspora* in salt lakes in Xinjiang, China

## 2.6 普氏菌属 (*Prauserella*)

1999 年 Kim 等对 *Amycolatopsis rugosa* (Lechevalier *et al.*, 1986) 进行了再分类, 建立了 *Prauserella*。随后, 我室于 2003 年发表了 *Prauserella halophila* 和 *Prauserella alba* 两个普氏菌新种 (Li *et al.*, 2003c)。三个普氏菌都和盐环境相关, 但只有 *Prauserella halophila* 为嗜盐菌。普氏菌属是一类仅能从高盐环境潮湿土样中分离得到的放线菌, 所以分离样品必须是新鲜的, 且不能经过高温处理。新疆盐湖高盐环境的普氏菌分离菌株 16S rRNA 基因序列的相似性比较高 (图 6), 提示在该环境中的普氏菌属物种多样性比较低, 也可能是因为分离方法造成了单一的现象。

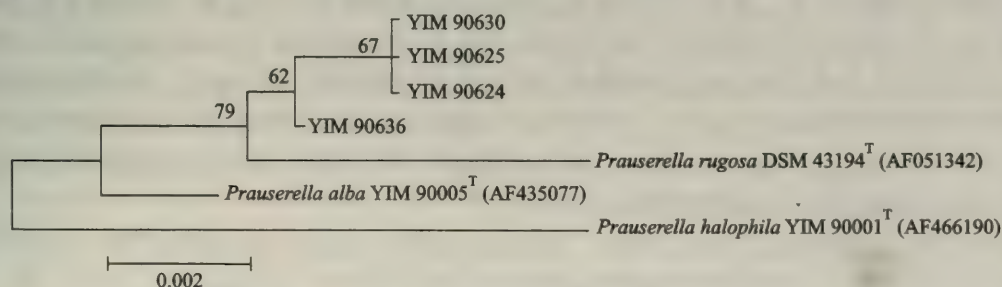


图 6 新疆盐湖环境普氏菌的物种多样性

Fig. 6 Species diversity of the genus *Prauserella* in salt lakes in Xinjiang, China



### 3. 总结与展望

通过有效的高盐环境放线菌的分离方法,大批的真正嗜盐的放线菌菌株从新疆高盐环境中被分离,在一定程度上揭示了新疆盐湖高盐环境中嗜盐放线菌的群落组成。其中,拟诺卡氏菌、链单孢菌和糖单孢菌是相对分布较广泛,且属于放线菌群落中的优势菌群。而放线多孢菌、普氏菌和糖多孢菌则表现出了地理分布特异性。比较不同地质形成年代的分离样点,发现地质形成年代较晚的样点(例如:甘家湖地区)的放线菌群落组成明显不同于艾丁湖等地质年代较古老的样点。这些地区多分布着耐盐的链霉菌、拟诺卡氏菌、普氏菌、小单孢菌和假诺卡氏菌等。

分离方法目前仍然是制约着微生物纯培养研究发展的关键环节。虽然目前分子生物学和分子生态学方法能够部分地解决微生物在生态环境中的位置和作用等问题,特别是宏基因组学和环境基因组学方法,以及基因芯片技术等。但是想要全面地了解不同微生物类群的生理生化、遗传进化和群体间的相互作用,还必须得到微生物的纯培养。在微生物的纯培养研究方面,还需要更多的关注(Rothschild, 2006)。面对自然环境中多于99%的未培养微生物(Amann *et al.*, 1995),这既是一种挑战,也是一种机遇。微生物分离方法的研究需要考虑各方面的因素:微生物与微生物之间,微生物与环境之间,甚至微生物与人之间的关系。这些因素已经复杂到我们目前无法同时考虑的地步。所以只能首先考虑那些影响微生物分离培养的主要因素,例如:生态环境中的主要营养源,微生物的主要生理需求等。本文中,我们主要根据新疆高盐环境的特征,分布于该环境中放线菌的生理特征,设计合适培养基,并筛选了较为理想的分离培养条件。同时,用该方法分离到大批的嗜盐和耐盐放线菌,初步揭示了新疆高盐环境的放线菌群落组成明显不同于普通土壤环境中以链霉菌为优势菌群的放线菌群落组成。

不同生态环境中的微生物群落组成不同,为进行微生物生物地理学的研究提供了一个值得研究的课题和支撑点。生物地理学是研究生物多样性的空间分布模型和过程的学科,当地理隔离成为宏观生物世系物种形成过程中的主要机制时,生物地理学的知识是理解生物进化的关键。达尔文通过正确评价生物地理学的数据,和理解这些数据在动物与植物进化中的含义,而提出了自然选择的理论。目前,植物和动物生物地理学已经得到了相当的发展。但是,由于微生物惊人的扩散能力和巨大的群体规模,使得人们一度认为微生物与地理学是不相关的。这种观点被 Becking M W 和 Bass B 总结为“Everything is everywhere; but the environment selects”,换句话讲,如果环境在生态学意义上是满足微生物生存需要的,那么微生物生境位于什么地点,或者周围有什么样的地理和气候屏障就都没有关系了。近些年来越来越多的研究成果对此观点提出了挑战(Martiny *et al.*, 2006)。实际上,“Becking-Bass”假说确实引起了很多关于微生物地理和环境分布的研究,以及关于基础生态学和进化问题的思考。

对于选择压力相对较大的高盐环境中,微生物的群落组成结构与普通环境不同,我们的研究证明了这一点。同时,高盐环境中的微生物类群分布也表现出了一定的地域性,另外,其分布也受到地质演变的影响。这些问题都是值得进一步研究的。随着分离方法的进一步突破,相关生态学研究方法的改进,以及其他例如基因芯片等分子生物学方法的引入,微生物生物地理学必将得到突飞猛进的发展,人们对微生物进化的认识也会逐步加深。

## 参考文献

- 职晓阳, 蔡曼, 杨玲玲, 等. 建立放线菌门的证据 [J]. 微生物学通报, 2006, 33 (3): 181-183.
- 郑喜玉, 等著. 新疆盐湖 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 19-26.
- AL-TAI A M, RUAN J S. *Nocardiopsis halophila* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44: 474-478.
- AL-ZARBAN S S, AL-MUSALLAM A A, ABBAS I, et al. *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52: 555-558.
- AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiology Reviews, 1995, 59: 143-169.
- BOONE D R, CASTENHOLZ R W, GARRITY G M. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. New York: Springer, 2001.
- CHUN J, BAE K S, MOON E Y, JUNG S O, et al. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 1909-1913.
- CUI X L, MAO P H, TSENG M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51: 357-363.
- GOCHNAUER M B, LEPPARD G G, KOMARATAT P, et al. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1975, 21 (10): 1500-1511.
- KIM S B, GOODFELLOW M. Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* Lechevalier et al. 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49: 507-512.
- KROPPESTEDT R M, EVTUSHENKO L I. The family *Nocardiopsaceae*, The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria [M]. New York: Springer, 2006.
- LACEY J, GOODFELLOW M. A novel actinomycete from sugar-cane bagasse: *Saccharopolyspora hirsuta* gen. et sp. nov. [J]. Journal of General Microbiology, 1975, 88: 76-78.
- LECHEVALIER M P, PRAUSER H, LABEDA D P, et al. Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36: 29-37.
- LI M G, LI W J, XU P, et al. *Nocardiopsis xinjiangensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from saline soil sample in China [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53: 317-321.
- LI W J, XU PING, ZHANG L P, et al. *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui et al. 2001 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003a, 53: 1421-1425.
- LI W J, TANG S K, STACKEBRANDT E, et al. *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003b, 53: 1591-1594.
- LI W J, XU P, TANG S K, et al. *Prauserella halophila* sp. nov. and *Prauserella alba* sp. nov., moderately halophilic actinomycetes from saline soil [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003c, 53: 1545-1549.
- LI W J, KROPPESTEDT R M, WANG D, et al. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 1089-1096.



- LI W J, PARK D J, TANG S K, et al. *Nocardiopsis salina* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from saline soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1805-1809.
- MACELROY R. Some comments on the evolution of extremophiles [J]. *Biosystems*, 1974, 6: 74-75.
- MARTINY J B H, BOHANNAN B J M, BROWN J H, et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map [J]. *Nature Review Microbiology*, 2006, 4: 102-112.
- MEYER J. *Nocardiopsis*, a new genus of the order Actinomycetales [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1976, 26: 487-493.
- NONOMURA H, OHARA Y. Distribution of actinomycetes in soil. X. New genus and species of monosporic actinomycetes [J]. *Journal of Fermentation Technology*. 1971, 49: 895-903.
- ROTHSCHILD L J. A microbiologist explodes the myth of the unculturable [J]. *Nature*, 2006, 443: 249.
- RUAN J S, AL-TAI A M, ZHOU ZH, et al. *Actinopolyspora iraqiensis* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44: 759-763.
- STACKEBRANDT E, RAINEY F A, WARD-RAINEY N L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47: 479-491.
- TANG S K, LI W J, WANG D, et al. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from saline and alkaline soils [J]. *Actinomycetologica*, 2003, 17: 6-10.
- WOESE C R. Bacterial evolution [J]. *Microbiology Reviews*, 1987, 51 (2): 221-271.
- YASSIN A F, GALINSKI E A, WOHLFAHRTH A, et al. A new actinomycete species, *Nocardiopsis lucentensis* sp. nov. [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, 43: 266-271.
- YOSHIDA M, MATSUBARA K, KUDO T, et al. *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41: 15-20.

## 植物内生放线菌研究进展

秦 盛<sup>1</sup> 陈华红<sup>1,2</sup> 李 洁<sup>1</sup> 赵国振<sup>1</sup> 徐丽华<sup>1\*</sup> 李文均<sup>1\*</sup>

(1 云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室,  
昆明 650091; 2 楚雄师范学院化学与生命科学系, 楚雄 675000)

### Advances in Research of Endophytic Actinomycetes

Qin Sheng<sup>1</sup> Chen Hua-hong<sup>1,2</sup> Li Jie<sup>1</sup> Zhao Guo-zhen<sup>1</sup> Xu Li-hua<sup>\*</sup> Li Wen-jun<sup>1\*</sup>

(1 Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2 Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal School, Chuxiong 675000, China)

**摘 要** 植物内生放线菌生活于宿主植物组织内, 是一类研究得不多, 但在医药、农业和工业上具有很大应用潜力的资源。植物内生放线菌与宿主植物之间长期的协同进化关系, 使得内生放线菌能够产生抗生素、植物生长激素、酶等众多生物活性物质, 并且表现出促进宿主植物生长, 提高宿主植物对环境胁迫抗性等能力。目前对植物内生放线菌的研究开展得越来越多, 但是诸如内生放线菌的起源与进化以及生态学等许多问题人们还很不清楚。本文就植物内生放线菌领域目前研究的方向, 综述了尚有争议的内生菌的定义、内生放线菌纯培养分离方法以及多样性研究的现状和技术手段, 论述了内生放线菌目前在医药、农林业等领域的实际应用情况, 分析了内生放线菌和宿主植物相互关系研究的最新进展, 侧重于内生放线菌和植物分子水平相互作用的研究现状和发展趋势, 并对植物内生放线菌领域值得进一步深入思考和研究的问题进行了展望。

**关键词** 内生放线菌; 分离; 多样性; 应用; 相互关系

**Abstract** Endophytic actinomycetes, which exist in the inner tissues of living plants, are relatively less studied. They are potential sources for exploitation in medicine, agriculture, and industry. Endophytic actinomycetes can produce lots of bioactive compounds, such as antibiotics, plant growth hormones and enzymes, and may contribute to their host plants by promoting their growth and enhancing their ability of resisting the environmental stresses. Although, more and more researches have focused on the endophyt-

基金项目: 国家 973 项目 (2004CB719601), 国家自然科学基金 (30560001), 教育部新世纪优秀人才支持计划, 云南省中青年学术和技术带头人后备人才基金资助。

\* 通讯作者: Tel/Fax: 86 - 871 - 5033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn; lihxu@ynu.edu.cn



ic actinomycetes, those fundamental questions about the evolutionary origin and ecological role of such endophytes remain to be answered. In this paper, a series of research questions in terms of the definition, isolation methods, diversity, application and interactions between endophytic actinomycetes and their hosts are reviewed. Some issues which remain obscure and need to be further considered in the research of endophytic actinomycetes are also discussed.

**Key words** endophytic actinomycetes; isolation; diversity; application; interaction.

## 1. 前言

放线菌是指 DNA G + C 含量在 50 mol % 以上的革兰氏阳性细菌, 属于细菌域放线细菌门。放线菌的数量大、种类多且有重大经济价值, 而且分布广泛。自 1940 年 Selman Waksman 发现放线菌素以来, 放线菌一直是抗生素、酶和酶抑制剂等有用生理活性物质的主要产生菌。迄今为止, 微生物产生的 2 万多种生物活性物质 (如抗生素等), 有近 60% ~ 80% 是放线菌产生的 (Bills *et al.*, 2002)。其中放线菌产生的抗肿瘤物质占 88%, 抗菌类物质占 74%, 其他活性物质占 55%。目前在微生物产生的 22 500 多种各类生物活性物质中仅有 140 ~ 170 种得到应用, 不到总数的 1%, 而放线菌产生的 10 100 种活性物质, 就有 100 ~ 120 种得到应用, 占应用品种总数的比例高达 71%。因此放线菌是目前开发微生物药物潜力最大的一类微生物资源。然而, 由于抗生素的广泛应用, 致病菌对现有药物的抗药性不断增强, 促使人们必须寻找更为有效的抗生素。随着微生物资源研究的深入, 目前从传统的土壤放线菌中寻找新的生物活性物质越来越难。近年来, 人们从微生物中分离得到的化合物, 有近 99.9% 是重复发现的 (Zaner & Fiedler, 1995)。因此开发研究新的生态栖息地的微生物是一个很好的策略。

植物内生菌 (包括真菌、细菌和放线菌) 是一个相对未开发的新资源, 目前已经受到越来越多的关注, 是新物种和新基因的一个丰富而可靠的资源, 而新基因和新物种通常又意味着新的天然产物 (Wink, 2004)。近来发现的新的生物活性物质有 51% 分离自内生菌的新种, 而仅有 38% 分离自土壤微生物 (Schutz, 2001)。因而, 植物内生放线菌极有可能成为发现新药用先导化合物的重要来源。

化石研究的证据表明, 植物与其内生菌之间的内生关系 (endophytic relationships) 早在高等植物开始出现在地球上的时候就已开始发展 (Strobel, 2003)。这种古老而又极为丰富多样的协同进化关系的长期维持, 使得内生菌发生遗传变化, 甚至整合宿主植物的 DNA 到自己的基因组上 (Germaine *et al.*, 2004), 从而更好地适应植物体内的微环境。这一方面保证了内生菌在植物体内得到足够的营养以维持生存, 另一方面促使某些内生菌能够产生抗生素、植物生长激素等生物活性物质, 尤其是一些内生菌获得了产生和宿主植物相同或类似化合物的能力 (Stierle *et al.*, 1993), 从而使内生菌表现出一系列如促进植物生长、提高植物对病虫害的抗性等生物学作用。

鉴于植物内生菌在医药、农林业等领域的诱人的应用前景, 越来越多的研究人员开始关注并研究这一新的微生物资源, 并且目前的研究已经从内生菌的分离、多样性、应用, 以及内生菌与宿主植物的相互关系等多个方面展开。本文综述了植物内生放线菌研究的最新进展。

## 2. 植物内生菌的定义

自 100 多年前, 人们发现植物中存在有内生菌以来, 对内生菌的定义一直有较大的争议。不

同的研究者由于研究的侧重点不同,对内生菌定义的理解也有很大差别。但大多都认可内生菌是能生活于健康植物组织内部,而不引起任何明显症状的微生物(Chanway, 1996)。Bacon 等作出了一个较具总结性,并被普遍接受的定义,植物内生菌(endophytes)是指在生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙,不引起植物产生明显病症的微生物(Bacon & White, 2000; Li *et al.*, 2001)。为便于研究, Hallmann 等(1997)根据植物与内生菌的相互关系认为植物内生菌应满足两个要求:①可从表面消毒的植物组织或植物组织内部分离到;②不对植物造成可见的伤害。因此植物内生菌应包括一切生活在植物体内的腐生、寄生和共生真菌、细菌与放线菌等,也包括那些潜伏在宿主体内的病原微生物,是一个生态学概念,而非分类学单位。Rosenblueth 和 Martinez-Romero (2006)还提出了“真”内生菌的说法,认为“真”内生菌应具备几个条件:一是可从表面消毒的植物组织分离得到;二是应具备可见的显微学证据证明其的确生活于植物组织内;三是应具备重新感染已消毒幼苗的能力。这个定义较为严格,避免了一些混乱,但由于显微学证据难以获得,为便于研究本文还是采用 Hallmann 所作的定义。

### 3. 植物内生放线菌的分离

#### 3.1 宿主植物的选择

由于植物的种类极为丰富,在植物内生放线菌的研究中,要提高获得新物种、新基因和新的生物活性物质的几率,植物的选择非常重要。相对于土壤等其他环境来说,植物内生菌是一个相对未知且多样性相当丰富的领域,而且内生菌所产生的活性化合物可以对宿主植物起到保护作用。

为了获得内生菌,我们首先选择有兴趣的植物,主要根据植物的生物学作用、年龄、地理分布特点、民族用药历史或者独特的生存环境的原则。Strobel 等(2004)认为应该从以下几个方面来优先选择研究内生菌的植物:①生物多样性丰富地区的植物,如生长在热带或亚热带地区的植物种类要比生长在干旱和寒冷地区的植物种类丰富,其内生菌的多样性也相对要高;②本土植物,拥有较长的生长时期,或者生长在某个较为古老的地带,如 Gondwanaland, 其内生菌产生活性物质的几率要更高;③生长在独特甚至极端环境下并拥有自身独特的生存机制的植物;④具有民族、土著用药历史的植物,以及药用化学成分已经被详细研究过的植物,其内生菌有可能产生和宿主植物相同或类似或者比植物活性更强的活性化合物。目前为止,对于热带雨林植物内生菌的研究还很少,正在渐渐消失的热带雨林蕴藏着丰富的内生菌资源,值得去开发研究。Strobel (2003)还认为生长在潮湿、温暖和独特的气候环境下的本土植物是研究内生菌的首选。例如位于中美洲委内瑞拉的热带雨林、澳大利亚的季风区域、亚洲的金三角地区、巴布亚新几内亚的丘陵和海岸地带、马达加斯加群岛和亚马孙河流域,它们都是世界上生物多样性最为丰富的地区(Mittermeier, 1999),都有着充足的降雨量,植物种类丰富,而且有着许多本土植物,其内生菌资源就非常值得研究。因此,植物的选取在获得和研究内生菌的整个过程中是非常重要的步骤。

#### 3.2 内生放线菌的分离方法

内生菌的研究中,主要根据研究目的和经验采集植物的不同部位。植物样品采集后,修剪成长短适宜的组织块,使用乙醇擦拭样品表面或用无水乙醇短时间(根据组织块的大小而定)浸泡,灼烧,使表面干燥后,放入无菌塑料袋中,封口,并保存于低温盒中带回实验室。也可以把经乙醇初步表面消毒后的样品保存于磷酸缓冲液中(Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005)。采样后使用乙醇简单消毒并干燥的目的是为了尽可能避免外源微生物通过植物组织的伤口侵入到植物组织内



部,同时也是为了抑制腐生菌生长。样品接种前通常应保存在4℃。尽量缩短从采样到接种的时间,可减少组织表面腐生菌对内生菌的影响。

内生菌的分离中,表面消毒是一个关键性的步骤。进行表面消毒前,样品的清洗极为重要,样品表面残留的土壤等是导致表面消毒不彻底的原因之一,可使用流水冲洗和超声波清洗。多数研究人员使用 Tween 20、无菌水、乙醇和次氯酸钠进行表面消毒。乙醇的浓度在99%~70%之间,而次氯酸钠的有效氯含量通常为10%~1%之间,各人使用的浓度有所差异。而用乙醇和次氯酸钠处理的时间也随使用试剂的浓度和处理的植物样品不同而异。除次氯酸钠外,也可以使用升汞和甲醛作为表面消毒剂。升汞是剧毒物质,虽然杀菌力极强,但对组织有刺激性,在常温下即可蒸发形成汞蒸气,易引起人慢性汞中毒。甲醛也为较高毒性的物质,具有强烈的致癌和促癌作用。虽然次氯酸钠放出的游离氯也可引起中毒,但毒性相对升汞和甲醛较低。此外,也可以使用双氧水和高锰酸钾作为消毒剂(Zhang *et al.*, 2006)。

表面消毒后的样品通常使用无菌的刀切成边长约为5 mm的正方形小块放入培养基平板,也可放入无菌的研钵或研磨仪中捣碎成糊状后,涂于培养基上。还可把表面消毒后的样品接种于相应的液体培养基,摇瓶培养24 h后,取培养液涂布于平板上。

因为要验证分离物是真正的内生菌而不是外源菌的程序繁琐且比较困难,因此,表面消毒效果的检验是一种间接的检验方法,是非常关键的步骤。表面消毒效果的检查方法主要有两类:一类是将表面消毒后最后一遍清洗的无菌水按0.1 mL/皿涂布于分离培养基,或是把表面消毒后的样品置于培养基表面擦拭几下后,移走样品。28℃下培养2周后观察,如无菌落长出,表明表面消毒彻底,已消除了样品表面的附生菌。也可把表面消毒后的样品置于无菌水中,振荡1 min后,取0.3 mL悬液涂布于分离培养基上,28℃培养数天后,观察是否有菌生长。第二类是把内生放线菌和内生假单胞菌的孢子悬浮液,经过表面消毒程序处理后,涂布于平皿,培养一定时间后,和未经处理的孢子悬浮液涂布的平皿比较,并观察两类平皿上菌落的生长情况。如经处理的孢子悬浮液涂布的平皿无菌生长,则表明表面消毒彻底。或是把内生放线菌涂于经过表面消毒的植物种子表面,待干燥后,再把种子用无菌水洗涤后经表面消毒处理,消毒后的种子置于培养基表面滚动几下后移走,培养一段时间后,如无菌落长出,表明表面消毒彻底(Coombs & Franco, 2003)。

在内生放线菌的分离中,放线菌的生长较为缓慢,通常一到一个半月的时间在植物表面才有菌落长出(Kunoh, 2002),因此要获得尽可能多的放线菌,既要尽量抑制真菌和细菌的生长,同时又要尽可能避免影响内生放线菌的生长。因此样品的预处理、选择性分离培养基的设计和抑制剂的使用都极为重要。一些贫营养的培养基和土壤放线菌分离中所使用的部分经典培养基在内生放线菌的分离中都取得了较好的效果(Tan *et al.*, 2006; Taechowisan *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2005; Coombs & Franco, 2003)。研究也表明,目前分离得到的内生放线菌远比植物组织内实际存在的类群少(Conn & Franco, 2004),因此内生菌分离方法的进一步改进非常重要。

#### 4. 植物内生放线菌的多样性

地球上近30万种植物,从寒带、温带、亚热带、热带的各个不同的气候带,从平原到丘陵、高山、湖泊等各种不同的地理环境都有植物分布。因此陆生高等植物为微生物提供了一个无论在时间还是空间上都极为复杂多样的生态栖息地。而植物的组织类型、植物的来源、年龄、植物所处的环境以及季节等因素都有可能影响内生菌的种群类型、组成及数量。从人们已研究的植



物看, 尚未发现不含内生菌的植物, 因此推测地球上每一种植物中都有一种或多种相应的内生菌生活, 但迄今为止, 只有少数植物的内生菌被较为系统地研究过, 因此从生活于不同生境和生态系统的大量植物中发现新的有用内生菌种的几率较高。已有的研究表明, 内生菌代表了一个极为巨大而多样的基因库和微生物新物种的丰富来源。

过去对内生菌的研究主要集中在内生真菌和细菌上, 而对内生放线菌则没有系统的研究, 仅有少数的报道。最早被发现的内生放线菌是能在非豆科植物根部形成根瘤并具有固氮能力的弗兰克氏菌属 (*Frankia*)。对于弗兰克氏菌已经有了较多和深入的研究, 本文主要介绍非弗兰克氏菌内生放线菌多样性的研究。

植物内生放线菌多样性的研究方法与其他自然环境微生物多样性研究方法基本一致, 主要分为两大类: 其一为传统研究方法, 即从植物样品中分离获得微生物的纯培养物, 通过对纯培养物的表型特征、生理生化特性以及基因型特征进行分类鉴别, 并了解该环境中微生物的分布与特点; 其二为不依赖于培养的研究方法, 它不要求纯培养物的获得, 而是直接通过检测来自植物样品中的生物大分子, 尤其是 DNA 来研究植物中微生物的多样性。

目前人们已经从棉花、玉米、水稻、小麦、马铃薯、豆类和谷类等多种草本和木本植物中分离到 *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium* 等属的放线菌 (Bacon & White, 2000)。而目前分离到的丝状内生放线菌绝大多数属于链霉菌属。从生长于泰国清迈的 36 种植物中分离到 330 株内生放线菌, 绝大多数属于 *Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia* 和 *Micromonospora* 等属 (Tae-chowisan *et al.*, 2003)。从生长于中国的香蕉中分离到 131 株内生放线菌, 分别属于 *Streptomyces*, *Streptoverticillium* 和 *Streptosporangium* (Cao *et al.*, 2005)。从生长于澳大利亚的小麦中分离到的内生放线菌分别属于 *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* 和 *Nocardiods* (Coombs & Franco, 2003)。Sardi 等 (1992) 从 28 种植物的根中分离到 499 株内生放线菌, 96% 以上是链霉菌, 其余分属于 *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora* 和 *Streptosporangium*。Caruso 等 (2000) 从生长于意大利的木本和草本植物中分离到 *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Kitasatospora*, *Micromonospora*, *Nocardioforme* 和 *Streptomyces* 这几个属的放线菌。我们从生长在云南西双版纳热带雨林中的多种药用植物中分离到 2700 多株内生放线菌, 共分布于 23 个属中, 显示热带雨林植物内生放线菌多样性极其丰富, 其中链霉菌为优势属, 占到 87% 以上, 这和国外学者研究结果一致。但是可培养的内生放线菌的多样性很大程度上还要取决于放线菌的分离方法。

相对于土壤和根际环境来说, 植物内生环境是研究得较少的新环境, 且内生放线菌受多种环境因素的影响, 可能蕴藏着大量的新物种。从日本猫尾木 (*Typha latifolia*) 叶、根以及泥炭藓上分离到 11 株具有运动孢子的放线菌, 均为动单孢菌属 (*Kineosporia*), 除其中一个种为该属仅有的一个种外, 另外四个种均为该属的新种 (Kudo *et al.*, 1998)。Yoon 等 (2004) 从韩国香瓜中分离到两株两面神菌属的新种。古强等 (2006) 还从木蝴蝶植物的根部分离到一株假诺卡氏菌属的新种。本课题组也从西双版纳热带雨林的药用植物中分离到糖霉菌属、假诺卡氏菌属、微球菌属和糖多孢菌属的多个新物种和潜在新物种 (陈华红等, 未发表资料)。

近年来应用不依赖于培养的基于 16S rRNA 基因的相关技术, 证实了在植物体内还存在大量难以培养的放线菌类群。Sessitsch 等 (2002) 通过 16S rRNA 基因测序、变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术分析了三种马铃薯内生放线菌的种群多样性, 发现马铃薯内存在大量链霉菌, 并推测这些链霉菌具有防治马铃薯疮痂病的潜在性。Conn 和 Franca (2004) 使用 16S rRNA-TRFLP 技术研究了来自三种不同土壤的小麦根内生放线菌 (*Actinobacteria*) 多样性。发现不同土壤类型



中生长的小麦根内生放线菌多样性是有差别的, 含有较多有机物的土壤会导致小麦根内生放线菌多样性提高, 并提高在植物体内定殖水平。用分子生物学方法检测的放线菌种类也多于传统的培养方法。Tian 等 (2007) 通过 16S rRNA-RFLP 分析研究了水稻茎和根中的内生放线菌的丰度与多样性, 和纯培养方法比较发现内生放线菌中链霉菌出现频率最高, 为水稻植株中的优势放线菌属。通过不依赖于培养的方法研究发现水稻中内生放线菌的种类非常丰富, 分布于 14 个属中, 远远超过了传统的分离培养方法所能够涉及的放线菌的范围。这些研究结果表明, 基于 16S rDNA 的分析技术克服了传统的纯培养方法的不足, 为我们进一步客观地认识植物内生放线菌多样性提供了有效的手段, 将有助于我们更好地了解植物内部微生物的全貌, 也有助于对植物与内生微生物之间相互关系的研究。

## 5. 植物内生放线菌与宿主植物关系的研究

内生菌与宿主植物的相互关系相当复杂, 二者在长期的协同进化中具有了独特的遗传与代谢, 彼此构成了稳定的生态关系。一方面, 植物为内生菌提供生活的营养需求。另一方面, 不同的内生菌又可能通过一定机制影响宿主植物的次生代谢, 促使宿主植物产生新的次生代谢产物或增强产生某些次生代谢产物的能力, 而且还影响植物的物质代谢、调节生理活性物质 (生物碱、激素等) 的产生, 从而改变植物的生理特性, 使宿主植物获得生理上的优势, 从而更有利于适应环境。很多植物内生菌还可帮助宿主获得更多营养, 并提高宿主对草食动物和寄生虫等的抵抗力及对于干旱等不良环境因素的适应力。影响二者相互关系的因素较多, 宿主植物本身受气候、土壤等外界的生物与非生物的因素影响, 内生菌也受到植物类型、生理状态、土壤等多种因素的影响, 其生理状态可在互生、共生, 独立生活和植物病原菌之间变化, 营养方式也会在寄生、临时性或兼性的腐生间转变。总之, 植物与内生菌二者的关系呈复杂多变的状态。

### 5.1 内生放线菌对宿主植物的侵染与定殖

虽然 Rosenblueth 和 Martinez-Romero (2006) 强调了真正的内生菌要有内生菌在植物体内定殖的直接证据, 到目前为止, 对于放线菌在植物体内定殖研究的报道还不多。扫描电镜和绿色荧光蛋白 (GFP) 标记系统的出现对内生菌在植物体内的定殖研究提供了有力的工具, 另外, 免疫学检测和设计特定的寡核苷酸探针也可以用来研究内生菌在植物体内的定殖 (Hartmann *et al.*, 2000)。该研究不但可以发现内生菌在植物不同发育时期植物体内定殖的部位, 而且可以知道内生菌对宿主植物以及植物特定部位的选择是否存在一定的专一性。

目前放线菌在植物体内定殖的研究国内还很少, 主要是真菌和细菌, 中国农业大学曾对棉花内生链霉菌进行探索研究过, 用扫描电镜照片证实了在棉花根皮层中存在内生链霉菌 (刘淑芬, 1996)。同样用扫描电镜还观察到内生放线菌在水稻植株体内的定殖 (田新莉等, 2004)。国外的研究报道多一些, Coombs 和 Franco (2003) 用 GFP 标记了一株从小麦中分离到的链霉菌 EN27, 通过荧光显微镜每 24 小时观测其在小麦种子中的定殖情况 (图 1)。他们发现随着时间的推移, 被标记的内生菌能在发芽的小麦种子的胚芽、胚乳以及刚生出的幼根中被观测到, 证明了内生菌在植物发育的早期就能定殖在植物体内, 而且定殖后的内生菌在植物体内并非静止, 而是能在植物体内不同部位移动。Okazaki (2003) 通过光学显微镜和扫描电镜直接观测到了植物表皮细胞上出现的内生小双孢菌的孢囊。Minamiyama 等 (2003) 通过扫描电镜证明 *Streptomyces galbus* 在杜鹃花组培幼苗培养基表面大量分布, 在植物叶表有菌丝生长, 然后通过气孔进入叶内部大量繁殖。Suzuki 等 (2005) 又研究了 *Streptomyces galbus* 侵染杜鹃花组培幼苗叶的方式, 证

实了菌丝侵染宿主植物是通过气孔开口而不是其他地方。研究发现,在植物叶内部生长的菌丝分布在细胞间隙中而不是植物表皮和叶肉细胞内。更为有趣的是,通过扫描电镜观察还发现大量的菌丝从侵染到定殖与密集而黏液状的物质有关,而单个菌丝没有这种现象,推测这些物质是大量菌丝从气孔开口处侵染,黏着到植物细胞表面以及进入植物细胞间隙所必需的。这个有趣的发现不禁让我们想知道这种物质是如何形成的,是什么引发其形成。内生放线菌侵染定殖宿主植物的过程还有待于深入研究。

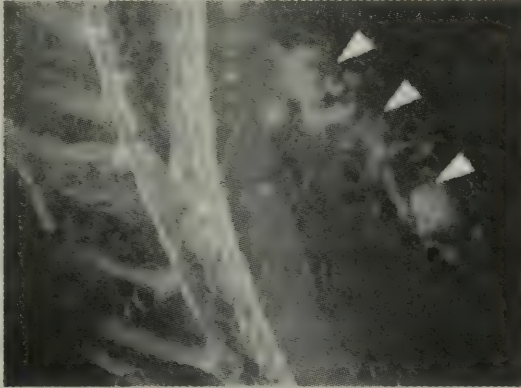


图1 GFP标记的内生链霉菌EN27在小麦胚乳种子中的定殖(Coombs & Franco, 2003)

Fig. 1 Microcolonies of *Streptomyces* sp. strain EN27 expressing GFP in the endosperm of wheat

## 5.2 内生放线菌对宿主植物生长发育的影响

内生放线菌对植物生长发育的影响更多的是促进作用,促进植物生长发育主要表现在以下几方面:一方面,内生放线菌影响植物体内的物质代谢,提高植物对碳、氮等资源的利用效率;另一方面,内生放线菌可以产生生长素等激素类物质,对于植株株高、干重、根茎重量的提高以及植株生长势的增强等均有明显的促进作用。分离自 *Pteridium aquilinum* 的植物内生菌 *Streptomyces hygroscopicus* TP-A045 可产生作用与茁壮素类似的 pteridic acids A 和 B,可促进植物生长(Igarashi *et al.*, 2002)。从野生杜鹃中分离到的 *Streptomyces* sp. MBR-52 可分泌某种促进生长的激素,可促进组培幼苗生根,缩短其环境适应期,减少组培幼苗感染疾病的风险(Igarashi *et al.*, 2006)。

研究发现,某些内生放线菌对植物生长还有抑制作用。有些内生放线菌可以侵入蔷薇科植物的根毛,并破坏皮层组织,引发根毛死亡,这种侵害被认为是引发蔷薇科植物某些种根部病害的病因(Otto & Winkler, 1998)。从植物狗筋蔓中分离到的一株指孢囊菌属的内生放线菌 SANK 61299,可以产生 streptol 和两种植物生长抑制剂,对植物莞根的萌发有抑制作用(Okazaki, 2003)。Furumai 等(2003)和 Igarashi 等(2003)从分离自桉叶树根部的放线菌 *Streptomyces hygroscopicus* 的发酵液中分离到一个新的植物花粉管生长抑制剂 clethramycin,通过对日本梨树的栽培试验发现,clethramycin 抑制花粉管生长,其抑制机理与激酶抑制剂 staurosporine 类似,对控制花粉萌发的 MAP 激酶具有抑制作用。

## 5.3 提高宿主植物对生物胁迫或非生物胁迫的抵抗力

生物胁迫的抗性主要包括阻抑昆虫和食草动物的采食、抵抗病虫害等,非生物胁迫的抗性主要包括干旱和高温耐性。内生放线菌生活在植物体内部,一方面从宿主植物得到需求的营养和保护,另一方面自身可以产生抗生素和水解酶,保护宿主植物免受病虫害的影响,提高植物对生物胁迫的抵抗力。Igarashi 等(2002)从多种植物的根、茎、叶部位分离得到 398 株内生放线菌,



发现近 20% 的菌株发酵液提取物对植物病原真菌和细菌有抑制作用。从一株野生的烈香杜鹃中分离到的链霉菌 R-5, 可产生 actinomycin X2 和 fungichromin 两种抗生素, 对杜鹃花属植物的两种主要的病原真菌 *Phytophthora cinnamomi* 和 *Pestalotiopsis sydowniana* 具有抑制性, 对革兰氏阳性细菌、酵母菌和丝状真菌也具有广泛的抗菌性 (Shimizu *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2004)。

内生放线菌还可提高植物的抗逆性。从植物 *Pteridium aquilinum* 中分离的内生链霉菌 *Streptomyces padanus* AOK-30 感染的山月桂组培幼苗, 细胞渗透压增加, 对干旱的耐受性明显提高 (Hasegawa *et al.*, 2004)。内生放线菌 *S. padanus* 可使山月桂组培幼苗获得对高盐浓度的耐受性 (Meguro *et al.*, 2006)。

#### 5.4 植物-内生放线菌的分子水平相互作用

植物与内生菌相互关系分子水平的研究是个诱人的领域, 美国植物病理学会 1987 年专门刊了植物与微生物相互作用研究领域的杂志 *Molecular Plant-Microbe Interactions* (MPMI), 每年都发表大量这方面的文章, 相对于非内生菌和植物间相互作用分子机制的研究, 目前对内生菌和宿主植物间分子相互作用的研究还很少, 仅有的报道也是内生细菌和真菌的研究。

植物内生菌侵入宿主植物后, 在植物体内定殖, 在特定的环境和生理条件下, 促使植物细胞相关次生代谢基因的表达, 尤其是植物抗逆有关的基因, 增强这些基因表达的速度和强度, 进而改变细胞相关酶的活力, 增强植物对外界胁迫的抵抗能力。de Matos Nogueira 等 (2001) 报道了甘蔗植物在固氮内生细菌——重氮营养葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) 和红苍白草螺菌 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) 定殖后的基因表达情况, 通过差异显示技术, 对植物 cDNA 序列的分析发现植物在内生菌定殖后发生与氮源吸收、碳代谢、植物生长以及植物对胁迫防御的相关基因的特异性表达。Bailey 等 (2006) 研究了可可树幼苗在具有生防作用的几株木霉在体内定殖后植物以及内生真菌相关基因的特异性表达情况, 通过差异显示技术对获得的 ESTs 序列的分析发现宿主植物一些对环境胁迫的相关基因得到了表达, 而内生真菌在共生状态下也有多种水解酶和氧化酶相关的基因表达, 通过定量 PCR 还对相关的 ESTs 序列进行了表达量上的差异分析。目前还没有内生放线菌这方面的研究报道, 但通过差异显示分析相关基因的表达策略同样适合于内生放线菌定殖后宿主植物基因表达的研究。另外, 基因芯片技术为大量分析基因特异性表达提供了便利, 通过该技术对一株具有促进植物生长作用的内生荧光假单胞菌 FPT9601-T5 在宿主植物鼠耳芥中的定殖研究后发现, 与对照植物相比有 95 个和 105 个基因的表达量明显增加和下降 (Wang *et al.*, 2005)。

内生菌为了进入植物组织内定殖并且生存, 同时和一些病原菌竞争, 也会发生相关基因的表达, 产生某些特定的物质, 在这一过程中也会有相关基因的特异性表达。然而由于研究方法的限制, 这方面的工作现在几乎没有。研究不同生境下基因表达的体内表达技术 (IVET) (Rediers *et al.*, 2005) 或许可以用在内生菌在宿主植物内定殖基因表达的研究上。目前, 随着越来越多的微生物全基因组测序的完成, 将对今后更深入地认识内生菌与宿主植物的分子相互作用提供巨大的帮助。

大量的研究工作表明, 细菌之间普遍存在着信息的相互交流, 即“群体感应系统 (quorum sensing, QS)”。“细菌可以根据特定信号分子的浓度来检测周围环境中自身或其他细菌的数量的变化, 并启动相关基因的表达来适应环境的各种变化 (Swift *et al.*, 1996)。细菌的 QS 系统可以调节一些植物病原细菌的生理功能, 包括产生抗生素、毒力因子以及降解植物细胞壁的水解酶等 (Von Bodman *et al.*, 2003)。然而植物也能感受到细菌的 QS 系统信号分子, 并且可以控制调节细菌的反应行为 (Bauer & Mathesius, 2004)。目前发现一些真菌中也存在着群体感应系统 (李

曼等, 2007)。因此, 植物内生菌在宿主植物体内是否也会产生 QS 信号分子? 内生菌之间以及内生菌和植物间通过信号分子是如何进行交流的呢? 植物向土壤中分泌的化学物质能诱导微生物发生特定的行为并产生 QS 信号分子, 而微生物受植物影响后也会对植物产生信息反馈作用 (Bais *et al.*, 2004), 通常内生菌可能来源于植物根际, 因此植物内生菌之间可能会和一些已经知道的病原细菌产生相同的信号分子, 并和宿主植物进行交流。就放线菌而言, 目前发现的 QS 信号分子还不多, 植物结合的链霉菌之间的 QS 信号分子 gamma-butyrolactones 在调节链霉菌和植物相互交流中发挥了作用 (Danhorn & Fuqua, 2007)。植物体内分离到的大量占优势地位的链霉菌是否也通过此 QS 信号分子彼此并与宿主植物交流还有待深入研究。

## 6. 植物内生放线菌的应用

在植物与内生菌长期的协同进化中, 内生菌的遗传与代谢都由于与植物的相互作用而与外界环境微生物不同。由于植物与内生菌间相互基因交换的结果 (Germaine *et al.*, 2004), 使内生菌具有产生某些与宿主植物相同或相似化合物的能力。因此内生菌在医药、农业、林业、化工等行业具有广泛的应用前景 (见图 2)。

### 6.1 在医药生产中的应用

植物内生菌是生物活性物质的一个重要来源, 如从某些具抗癌作用的植物中分离出的一些内生菌能代谢具有抗肿瘤活性的物质, 最典型的例子就是从红豆杉中分离出能产生紫杉醇 (taxol) 的内生菌。其他学者也从一些植物中分离到多种内生菌能产生具有不同作用机理的抗癌新物质。植物内生菌还能产生多种具有不同抗菌活性的物质, 对植物、动物和人病原菌有抑制活性。内生菌产生的抗生素类物质抗菌效果更高 (Li *et al.*, 2001)。为此, 内生菌成为寻找新的生物活性物质的重要来源。先前的研究主要集中在内生真菌上, 目前对内生放线菌的研究也取得了一定进展。

现已发现内生放线菌可产生多种具有抗病毒、抗菌活性的新抗生素。最早被发现的内生链霉菌分离自 *Lolium perenne*, 能产生具有弱抗性的甲基白诺氏菌素 (methylalbounorsin) (Guerny & Mantle, 2004)。从生长于德国耶拿的 *Alnus glutinosa* 中分离到一株链霉菌 (DSM 11575) 可产生一种新的萘醌抗生素 alnumycin, 对革兰氏阳性菌具有抑制性, 而对革兰氏阴性菌没有活性 (Bieber *et al.*, 1998)。Pullen 等 (2002) 从卫矛中分离到一株链霉菌 (*Streptomyces sampsonii*) 能产生一种新抗生素, 对一系列抗药性细菌和分枝杆菌有很强的抑制作用。Castillo 等 (2002) 从生长在澳大利亚北部的药用植物蛇藤植株中分离到的一株内生菌 *Streptomyces* NRRL30562 产生的缩氨酸物质 munumbicins A, B, C, D 对葡萄球菌的青霉素抗药菌株有抑制作用, 对能抗多种药物的分枝结核杆菌抗药菌株和引起人类疟疾的疟原虫也有抑制作用, 具有较高的应用前景。从生长于澳大利亚北部的一株蕨叶银桦属植物 *Grevillea pteridifolia* 中分离到一株内生链霉菌 NRRL 30566, 可产生一种新抗生素 kakadumycins A, 对革兰氏阳性菌具有广泛的抗菌性, 对引起疟疾的疟原虫也具有抗性, 可抑制 RNA 的合成。其作用与棘霉素相似, 但其活性比之更强 (Castillo *et al.*, 2003)。从生长于秘鲁的蓬莱蕉中分离到一株链霉菌, 可产生新的多肽类抗生素 coronamycin, 对真菌 *Pythiaceae*、人类病原真菌 *Cryptococcus neoformans* 和疟原虫 *Plasmodium falciparum* 具有抑制性 (Ezra *et al.*, 2004)。Taechowisan 等 (2005) 从一种姜科植物根中分离到的内生链霉菌 CMUAc130 中分离的活性化合物显示了很强的抑制病原真菌作用, 对引起香蕉植物炭疽病



和小麦植物枯萎病的病原真菌刺盘孢和尖镰孢菌都有很好的抑制作用。云南美登木共生放线菌菌株可产生具有抗菌活性的苯丙素类化合物(鲁春华和沈月毛, 2005)。从欧洲赤松中分离到的内生菌约有 25% 对金黄色葡萄球菌具有抑菌活性(Sheridan, 2006)。

内生放线菌还可产生多种具有细胞毒性的抗肿瘤化合物。沈月毛等(2000)从云南美登木和滑桃中分离到一些内生放线菌, 并对其进行了次生代谢产物的研究, 其中一些菌株可产生新的抗生素和抗肿瘤化合物。云南美登木的内生菌 *Streptomyces* sp. CS 可产生具有抗肿瘤、抗白血病和抗生素活性的新多羟基环己烷衍生物(鲁春华等, 2004)。一株内生的 *Streptomyces laceyi* MS53 可产生对人乳癌细胞具有细胞毒性的 salaceyins A 和 B (Kim *et al.*, 2006)。内生的 *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451 可产生对多种人类肿瘤细胞具有细胞毒性的 pterocidin (Igarashi *et al.*, 2006)。从一株内生小单孢菌新种中分离到的两个新的蒽醌类化合物 lupinacidins A 和 B, 对癌细胞 26 - L5 具有抑制作用而对植物细胞没有毒害 (Igarashi *et al.*, 2007)。

内生放线菌还应用于中草药的生产。特异性的植物内生放线菌促进中药内有效成分的生成或积累, 并可促进药用植物的生长, 提高其对干旱、高温等生物胁迫的抵抗力和对病虫害的抗性, 避免被食草动物采食(陈美兰和黄璐琦, 2007)。

## 6.2 在农林业中的应用

出于环境保护的考虑, 近年来在农林业生产中, 已逐步减少对许多合成农药的使用, 使用微生物来控制农林业害虫和病原体, 提高经济作物的抗逆性是一种较为安全有效的方法。同时, 新天然产物和新物种的不断发现也为新的更为安全的农用化学品的开发提供了更多机会。内生放线菌可通过产生抗真菌代谢物和几丁质酶等裂解酶来抑制土壤来源的植物病原微生物的生长, 并可产生植物生长调节剂促进植物的生长 (El-Tarabilya & Sivasithamparam, 2006)。一些农作物内生菌可产生抗生素并促进宿主的防御体系发挥作用。研究表明, 内生菌产生的抗菌剂、杀虫剂和植物生长调节剂可有效地防治宿主病害, 提高植物产品的产量和品质, 在生物防治上发挥重要的作用。而与通常使用根际微生物进行植物病害生物防治相比, 内生放线菌由于定居在植物体内, 避免了同根际众多微生物的竞争, 更具有竞争优势。

Matsuura (1998) 从生长于巴西热带地区的豇豆中分离到 31 株、5 个属的内生放线菌, 20% 的菌株对病原细菌有抑制作用。Araujo 等从生长在巴西北部的玉米叶和根中分离到 53 株内生放线菌, 活性筛选显示有近 43% 的菌株对病原细菌和酵母有抑制作用。从山月桂中分离到的内生放线菌 *Streptomyces* sp. AOK - 30 对杜鹃花科植物的各种病原真菌和酵母菌具有较为广泛的抑制活性, 且可使组培幼苗抵抗盘多毛孢属病而不引起任何消极反应 (Nishimura *et al.*, 2002)。从生长于泰国清迈的植物中分离到的 *Streptomyces* sp., 有 3 株对 *Colletotrichum musae* 有很强的抑制性, 有 5 株对 *Fusarium oxysporum* 有较强的抑制性, 有两株对两种植物病原菌均有较强的抗性 (Tae-chowisan *et al.*, 2005)。Coombs 等 (2004) 从小麦中分离到 38 株内生放线菌, 分别属于 *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora*, 和 *Nocardioideis*, 其中大部分对小麦病原菌 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 表现出抑制活性。从生长于墨西哥的 *Casuarina equisetifolia* 的根中分离到一个 *Thermomonosporaceae* 和一个 *Micromonosporaceae* 的菌株, 不但可以把乙炔降解为乙烯, 而且还可能具有固氮活性 (Valdés *et al.*, 2005)。从南美巴塔哥尼亚地区假山毛榉等植物中分离到 6 株链霉菌 (C1 - C4), 对马铃薯疫霉坏死病菌、核盘菌、香蕉黑条叶斑病菌等多种植物病原真菌均有明显的抑制作用 (Castillo *et al.*, 2007)。田新莉等 (2004) 对水稻内生放线菌进行了研究, 发现分离到的内生放线菌有 50% 对水稻的某些病原菌具有拮抗活性。Cao 等 (2005) 从香蕉根部分离到的一株 *Streptomyces* sp. S96 可增强植物对香蕉镰刀菌萎蔫病的抗性, 促进植物的生长。高

俊明等(2007)从健康番茄植株体内分离到一株编号为 ts-6 的放线菌,该菌株对番茄灰霉病菌、早疫病菌、枯萎病菌等具有较强的拮抗作用。

一些内生放线菌产生的具有独特生物活性的物质,可应用于生物环保、食品等方面。Stamford 等(2002)从薯蓣块茎中分离到的内生菌 *Nocardopsis* sp. 可产生具耐热性的  $\alpha$ -淀粉酶,从玉米叶中分离到的一株内生放线菌 *Streptosporangium* sp. 产生的葡萄糖淀粉酶在 70 °C 表现出 100% 酶活。研究发现,内生菌可使宿主植物彻底降解甲苯,从而减少对环境的危害 (Barac *et al.*, 2004) (图 2)。

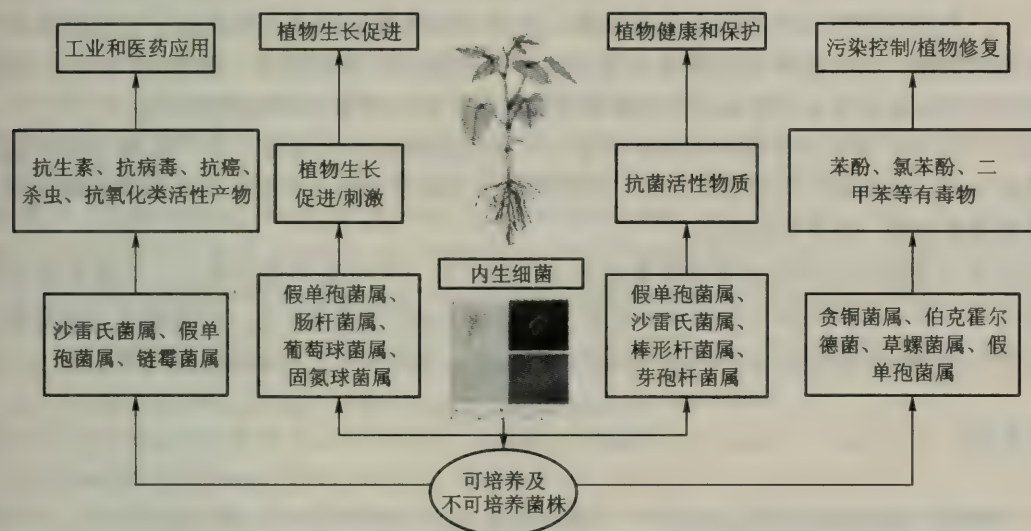


图 2 不同内生菌相互作用及其应用研究示意图 (Ryan *et al.*, 2008)

Fig. 2 Schematic diagram of different endophytes interactions and their applications

## 7. 研究展望

植物内生菌资源是近年来研究得较热的领域。目前国际上研究的主流还是设法从一些药用植物内生菌中寻找活性物质以及将一些经济作物内生菌应用于生物防治上。放线菌由于是活性物质的主要产生菌,因此近年来人们已经越来越关注植物内生放线菌这一相对未知资源的开发利用。开发利用这一资源将对药物的研制以及现代新型农业的发展具有重要的实践意义。植物内生放线菌与宿主植物二者长期协同进化,形成了互惠互利的共生关系,但是二者间生命活动相互调节的机制目前还很不清楚。随着这一问题的解决,内生放线菌这一诱人的资源无疑将会得到更好的开发与利用。

目前对植物内生放线菌的研究还不是很深入,研究的方向还需要拓展,这一领域还有许多值得研究者们深入考虑并研究的问题:

(1) 目前从植物组织内分离到的内生放线菌绝大部分还是链霉菌,稀有放线菌类群还不多,进一步改进内生放线菌的分离方法、尽可能分离到更多的类群还有待深入的研究,其前提是建立在了解并弄清楚内生放线菌生理学特性的基础上。由于二者共生关系相当复杂,因此这方面的研究难度较大。

(2) 内生放线菌是如何通过宿主植物的防御系统侵染植物的?这一过程中植物会有哪些免疫反应?内生放线菌怎样利用植物体内的营养生存?是否和一些内生真菌一样需要宿主细胞的死



亡, 内生放线菌才能生长繁殖 (Deshmukh *et al.*, 2006)?

(3) 内生放线菌提高宿主植物对生物与非生物胁迫抵抗力的机理, 植物与内生菌相互作用的分子机理, 尤其是植物和内生菌如何诱导相应基因的表达?

(4) 内生菌间是如何通过群体感应系统进行交流的? 内生菌和植物之间更是如何信号交流的? 内生菌和宿主植物间是否有基因物质的交流传递? 至少从现在的一些研究结果来看是存在的, 利用美登木和其内生放线菌共同培养才能产生美登木素的研究证明了这一观点 (Lu & Shen, 2004)。

(5) 一些内生放线菌本是潜在的病原菌, 比如一些诺卡氏菌是人致病菌, 由于环境的变化变成非致病性菌, 已有的研究发现内生菌之间存在着基因转移的现象 (Taghavi *et al.*, 2005), 这些潜在的病原菌是否会把致病基因转移给其他生菌, 从而对宿主植物产生病害?

(6) 利用分子遗传与进化相关的技术方法, 从生物地理学的角度, 更广泛的范围内进行内生放线菌和宿主植物间协同进化的研究, 探讨内生放线菌的起源与进化, 以及内生放线菌是否有宿主植物及器官专一性共生问题。

(7) 在生物防治的利用上通常需要回接内生菌, 在一个生态环境下引入一个新的物种可能会造成生态灾难, 而微生物的情况也许会更加严重。把一种微生物引入一个新的生态系统影响土著微生物的生长的程度到底有多大? 我们对自然界微生态系统的了解还是远远不够的。

## 参考文献

- 陈美兰, 黄璐琦. 道地药材形成的途径之一——植物内生菌 [J]. 中国中医药报, 2007, 26: 83.
- 高俊明, 马丽娜, 李欣, 等. 内生放线菌 ts-6 对灰葡萄孢的拮抗作用及其防病效果 [J]. 植物保护学报, 2007, 34 (1): 107-108.
- 鲁春华, 何以能, 沈月毛. 云南美登木共生放线菌菌株 CS 产生的新多羟基环己烷衍生物 [J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14 (1): 49-50.
- 鲁春华, 沈月毛. 云南美登木共生放线菌菌株 3C 产生的苯丙素类化合物 [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15 (3): 176.
- 李曼, 邱健, 宋水山. 真菌中的群体感应系统 [J]. 微生物学通报, 2007, 34 (3): 566-568.
- 刘淑芬. 棉花内生链霉菌及其防病作用研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 1996.
- 沈月毛, 甘烦远, 杜良成, 等. 多酮类化合物的生物合成 [J]. 化学进展, 2000, 2 (4): 401-408.
- 田新莉, 曹理想, 杨国武, 等. 水稻内生放线菌类群及其对宿主病原菌的抗性研究 [J]. 微生物学报, 2004, 44 (5): 641-646.
- BACON CW, WHITE JF. Microbial Endophytes [M]. New York: Marcel Dekker, INC, 2000.
- BAILEY B A, BAE H, STREM M D, et al. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species [J]. Planta, 2006, 224: 1449-1464.
- BAIS H P, PARK S W, WEIR T L, et al. How plants communicate using the underground information superhighway [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9 (1): 26-32.
- BARAC T, TAGHAVI S, BORREMANS B, et al. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants [J]. Nature Biotechnology, 2004, 22 (5): 583-588.
- BAUER W D, MATHESIUS U. Plant responses to bacterial quorum sensing signals [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7: 429-433.
- BIEBER B, NÜSKE J, RITZAU, et al. Alnumycin, a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. [J]. Journal of Antibiotics, 1998, 51 (3): 381-382.

- BILLS G, DOMBROWSKI A, PELAEZ F. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. [M] // WATLING R, FRANKLAND J, AINSWORTH A, ISSAC, S and ROBINSON C. Tropical Mycology. New York: CABI Publishing, 2002, 165-194.
- CAO L, QIU Z, YOU J, et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247 (2): 147-152.
- CARUSO M, COLOMBO A L, FEDELI L, et al. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers [J]. Annals of Microbiology, 2000, 50: 3-13.
- CASTILLO U, HARPER J, STROBEL G, et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 224: 183-190.
- CASTILLO U F, BROWNE L, STROBEL G, et al. Biologically active endophytic *Streptomyces* from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia [J]. Microbial Ecology, 2007, 53: 12-19.
- CASTILLO U, STROBEL G, FORD E, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans* [J]. Microbiology, 2002, 148: 2675-2685.
- CHANWAY C P. Endophytes: they're not just fungi [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 74: 321-322.
- CONN V M, FRANCA C M M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 1787-1794.
- COOMBS J T, FRANCO C. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69 (9): 5603-5608.
- COOMBS J T, FRANCO C M M. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69 (7): 4260-4262.
- COOMBS J, MICHELSEN P, FRANCO C. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat [J]. Biological Control, 2004, 29: 359-366.
- DANHORN T, FUQUA C. Biofilm formation by plant-associated bacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 2007, 61: 401-422.
- DE MATOS NOGUEIRA E, VINAGRE E, MASUDA F, et al. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* [J]. Genetics and Molecular Biology, 2001, 24: 199-206.
- DESHMUKH S, HÜCKELHOVEN R, SCHÄFER P, et al. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103: 18450-18457.
- EL-TARABILYA K, SIVASITHAMPARAM K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38: 1505-1520.
- EZRA D, CASTILLO U, STROBEL G, et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. [J]. Microbiology, 2004, 150: 785-793.
- FURUMAI T, YAMAKAWA T, YOSHIDA R, et al. Clethramycin, a new inhibitor of pollen tube growth with antifungal activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623. I. Screening, taxonomy, fermentation, isolation and biological properties [J]. Journal of Antibiotics, 2003, 56: 700-704.
- GERMAINE K, KEOGH E, GARCIA-CABELLOS G, et al. Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48: 108-118.
- GUERNY K, MANTLE P. Biosynthesis of 1-N-methylalbonoursin by an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from perennial ryegrass [J]. Journal of Natural Products, 2004, 56 (7): 1194-1198.
- HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, MAHAFFEE W F. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43: 895-914.



- HARTMANN A, STOFFELS M, ECKERT B, et al. Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes. In: Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process [M]. Wymondham, Horizon Scientific Press, 2000, 727-736.
- HASEGAWA S, MEGURO A, NISHIMURA T, et al. Drought tolerance of tissue-cultured seedlings of mountain laurel (*Kalmia latifolia* L.) induced by an endophytic actinomycete I. Enhancement of osmotic pressure in leaf cells [J]. Actinomycetologica, 2004, 18: 43-47.
- IGARASHI Y, IIDA T, SASAKI Y, et al. Isolation of actinomycetes from live plants and evaluation of antiphytopathogenic activity of their metabolites [J]. Actinomycetologica, 2002, 16: 9-13.
- IGARASHI Y, IIDA T, YOSHIDA R, et al. Pteridic acids A and B, novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451 [J]. Journal of Antibiotics, 2002, 55: 64-767.
- IGARASHI Y, IWASHITA T, FUJITA T, et al. Clethramycin, a new inhibitor of pollen tube growth with antifungal activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623. II. Physico-chemical properties and structure determination [J]. Journal of Antibiotics, 2003, 56: 705-706.
- IGARASHI Y, MIURA S, FUJITA T, et al. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygroscopicus* [J]. Journal of Antibiotics, 2006, 59 (3): 193-195.
- IGARASHI Y, TRUJILLO M E, MARTÍNEZ-MOLINA E, et al. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17: 3702-3705.
- KIM N, SHIN J, KIM W, et al. Cytotoxic 6-alkylsalicylic acids from the endophytic *Streptomyces laceyi* [J]. Journal of Antibiotics, 2006, 59 (12): 797-800.
- KUDO T, MATSUSHIMA K, ITOH T, et al. Description of four new species of the genus *Kineosporia*: *Kineosporia succinea* sp. nov., *Kineosporia rhizophila* sp. nov., *Kineosporia mikuniensis* sp. nov. and *Kineosporia rhamnosa* sp. nov., isolated from plant samples, and amended description of the genus *Kineosporia* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology, 1998, 48: 1245-1255.
- KUKLINSKY-SOBRA L J, ARAUJO WL, MENDES R, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean [J]. Plant and Soil, 2005, 273: 91-99.
- KUNOH H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents [J]. Journal of General Plant Pathology, 2002, 68: 249-252.
- LU C H, SHEN Y M. Harnessing the potential of chemical defenses from antimicrobial activities [J]. BioEssays, 2004, 26 (7): 808-813.
- LI J, HARPER J, GRANT D M. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp [J]. Phytochemistry, 2001, 56 (5): 463-468.
- MATSUURA T. Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de folhas e raízes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*). Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1998, 69.
- MEGURO A, HASEGAWA S, NISHIMURA T, et al. Salt tolerance in tissue-cultured seedlings of mountain laurel enhanced by endophytic colonization of *Streptomyces padanus* AOK-30. Abst 2006 Annu Meeting of Soc Actinomycetes; Japan, 97.
- MINAMIYAMA H, SHIMIZU M, FURUMAI T, et al. Multiplication of isolate R-5 of *Streptomyces galbus* on rhododendron leaves and its production of cell wall-degrading enzymes [J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69: 65-70.
- MITTERMEIER R A, MYERS N, GIL P R, et al. Hotspots, CEMEX Conservation International, Washington, DC, 1999.
- NISHIMURA T, MEGURO A, HASEGAWA S, et al. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from mountain laurel and its antifungal activity [J]. Journal of General Plant Pathology, 2002, 68: 390-397.
- OKAZAKI T. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves [M] // DI KURTOKE. Selective Isolation of Rare

- Actinomycetes. 1st ed. National Library of Australia, 2003, 102-121.
- OTTO G, WINKLER H. Influence of root pathogenic actinomycetes on the trimming of the rootlets of some species of rosaceae with root hairs [J]. *Acta Horticulturae* 1998, 47 (7): 49-54.
- PULLEN C, SCHMITZ P, MEURER, et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae [J]. *Planta*, 2002, 216 (1): 162-167.
- REDIERS H, RAINEY P B, VANDERLEYDEN J, et al. Unraveling the secret lives of bacteria: use of *in vivo* expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69: 217-261.
- ROSENBLUETH M, MARTINEZ-ROMERO E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19: 827-837.
- RYAN RP, GERMAINE K, FRANKS A, RYAN DJ, DOWLING DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications [J]. *FEMS Microbiology letters*, 2008, 278 (1): 1-9.
- SARDI P, SARACCHI M, QUARONI S, et al. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (8): 2691-2693.
- SCHUTZ B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. [C] // British Mycological Society International Symposium Proceedings, Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation. Swansea: University of Wales, 2001.
- SESSITSCH A, REITER B, PFEIFER U, et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rDNA genes [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39: 23-32.
- SHERIDAN C. Antibiotics au naturel [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (12): 1494-1496.
- SHIMIZU M, IGARASHI Y, FURUMAI T, et al. Identification of endophytic *Streptomyces* sp. R-5 and analysis of its antimicrobial metabolites [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 70: 66-68.
- SHIMIZUI M, NAKAGAWA Y, SATO Y, et al. Studies on endophytic actinomycetes. I. *Streptomyces* sp. isolated from rhododendron and its antifungal activity [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2000, 66: 360-366.
- STAMFORD T, STAMFORD N, COELHO, et al. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83 (2): 105-109.
- STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260 (9): 214-216.
- STROBEL G. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5: 535-544.
- STROBEL G, DAISY B, CASTILLO, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67 (2): 257-268.
- SWIFT S, THROUP J P, WILLIAMS P, et al. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21: 14-219.
- SUZUKI T, SHIMIZU M, MEGURO A, et al. Visualization of infection of an endophytic actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue cultured rhododendron [J]. *Actinomycetologica*, 2005, 19: 7-12.
- TAECHOWISAN T, LU C H, SHEN Y M, et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity [J]. *Microbiology*, 2005, 151: 1691-1695.
- TAECHOWISAN T, PEBERDY JF, LUMYONG S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 19: 381-385.
- TAGHAVI S, BARAC T, GREENBERG B, et al. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (12): 8500-8505.
- TAN H, CAO L, HE Z, et al. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* *in vitro* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22 (12):



1275-1280.

- TIAN X L, CAO L X, TAN H M, et al. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice [J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53 (4): 700-707.
- VALDÉS M, PÉREZ N O, SANTOS P, et al. Non-*frankia* Actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *casuarina equisetifolia* fix nitrogen [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (1): 460-466.
- VON BODMAN S B, BAUER W D, AND COPLIN D L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2003, 41: 455-482.
- WANG Y Q, OHARA Y, NAKAYASHIKI H, et al. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting Rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (5): 385-396.
- WINK J. Actinomycetes taxonomy in the Aventis strain collection [M] // D I KURTBOKE SWINGS J. *Microbial Genetic Resources and Biodiscovery*. [M] Queensland: Queensland Complete Printing Services, 2004, 249-261.
- YOON J H, LEE H B, YEO S H, et al. *Janibacter melonis* sp. nov., isolated from abnormally spoiled oriental melon in Korea [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1975-1980.
- ZANER H, FIEDLER H. In *Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends*. Russell N, editor [M] Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1995.
- ZHANG H W, SONG Y C, TAN R X. Biology and chemistry of endophytes [J]. *Natural Products Reports*, 2006, 23: 753-771.

# 分子生态与生态基因组学

Molecular Ecology and Ecological Genomics



# 中國通志卷之六

卷之六

一、地理志  
二、職官志  
三、選舉志  
四、風俗志  
五、禮俗志  
六、刑法志  
七、兵備志  
八、食貨志  
九、藝文志  
十、雜考

# 基因表达谱和基因芯片在生态毒理学中的应用与生态毒理基因组学研究进展

刘立娜 段昌群\*

(云南大学生命科学学院暨云南生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地, 昆明 650091)

## Advances in Applications of Gene Expression Profiling and Microarrays in Ecotoxicology and Ecotoxicogenomics

Liu Li-na Duan Chang-qun\*

(Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resource & School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**摘 要** 基因表达谱方法通过分析生物体内基因表达格局的变化, 可以在分子水平上认识生物适应环境的过程和机理, 基因芯片技术的应用则提供了更加全面和准确的基因表达谱的数据结果。作为研究有毒物质作用的生态机制、生物适应污染环境的对策及响应动态的生态毒理学, 基因表达谱和基因芯片技术的应用将能更加纵深地提高有关生物应对污染环境的生态机制的认识和了解。本文述评了基因表达谱及其研究方法(差异显示技术、代表性示差分析、抑制性消减杂交、表达序列标签、基因表达连续分析)的原理、优缺点及应用; 基因芯片和应用操作; 以及生态毒理学中用基因芯片技术的基因表达谱在生物对污染胁迫的分子生态响应机制, 污染物的作用方式, 发现关键功能基因等方面的近期重要资料数据; 对生态毒理基因组学的提出和发展进行总结, 并对这种技术发展动态进行了展望。

**关键词** 基因表达; 基因芯片; 环境污染; 分子生态响应机制; 生态毒理基因组学

**Abstract** Gene expression profiling may provide us with a better understanding of the processes and mechanisms about organisms' responses to environmental contaminations at the molecular level by analyzing changes of the gene expression pattern. Ecotoxicology studies the ecological mechanisms of toxicolo-

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760049, 30640022), 国家 973 项目(2003CB14510305), 教育部新世纪优秀人才支持计划(NTET-4-0914)及高等学校博士学科点专项科研基金(20040673002)资助。

\* 通讯作者: chqduan@ynu.edu.cn



gy, the ecological strategies and the dynamic responses of organisms adaptation to environmental contaminations. The applications of gene expression profiling and gene chips in ecotoxicology will help comprehend deeply the ecological mechanisms about organisms' responses to environmental contaminations. We review the usefulness of gene expression profiling and the principle, advantages and current limitations of the technologies that include mRNA differential display-PCR, cDNA-representational difference analysis, suppressive subtractive hybridization PCR, expressed sequence tags and serial analysis of gene expression. Further more, we introduce importantly the operations of gene chips and analyze the recently vital applications in several ways, for example the molecular ecological responses of organisms to pollutions, the discovery of the specifically functional genes, and the improvement of exotoxicogenomics. Finally, the problems of this technology are discussed and the development is prospected in this paper.

**Key words** gene expression; microarrays; environmental pollution stress; molecular ecological response mechanism; ecotoxicogenomics

基因组学和蛋白质组学的发展,使人们对生命活动的微观过程有了全新和全景式的认识。其中人类更关注的是蛋白质的合成,以及相关过程中基因表达模式的适应性调整问题 (Sonenberg, 2002)。而目前生态毒理学家需要解决的主要问题就是认识有毒物质在生物体中的作用机制,探讨生物对有害物质的响应途径。基因组学的研究告诉我们,基因表达模式的适应性调整是生物各种响应的基础。基因表达谱提供了污染条件下生化响应途径以及基因表达量增加的信息,阐明了生物的代谢调控网络系统和生物对生物、非生物胁迫反应的信号转导途径,并从中揭示有毒物质可能的作用机制 (Snell *et al.*, 2003)。随着基因组学的发展,基因芯片技术应运而生。应用表达芯片技术获得的基因表达谱结果更加精确,而且具有高通量,灵敏度高,快速,使用实验材料少,相对节省实验经费的优点。基因芯片技术及其相关方法可以用于分析基因表达量的变化,认识不同污染物及不同浓度的作用方式、污染物之间的相互作用,理解生物的响应机制,发现新功能基因,鉴定污染物种类,筛选不同响应范式的作物种质。有鉴于此,本文试图述评基因表达谱和基因芯片在生态毒理学中的应用状况,为污染生态学的发展,尤其是新兴的生态毒理基因组学的引入提供基础资料。

## 1. 基因表达谱和基因芯片

### 1.1 基因表达谱及其研究方法

基因表达谱是指细胞中所有基因表达的格局,它能对来源于不同个体、组织、细胞周期、发育阶段、分化阶段、生理病理、刺激条件下的基因表达情况进行对比分析,从而对基因群在个体、组织、发育、分化、疾病、刺激的特异性变化特征和规律进行描述,可以进一步阐明基因的相互协同、抑制、互为因果等关系。通过对基因表达谱的分析可以研究整体水平上的代谢机制,认识基因相互作用的网络关系,发现重要功能基因。生态学是研究有机体与其周围环境相互关系的科学 (孙儒泳等, 2003), 它的研究内容包括在个体、种群、群落、生态系统等宏观层次上和分子、细胞等微观水平上探讨生物与环境之间的相互关系。从生态学角度开展基因表达谱的研究可以揭示环境中生物体之间以及生物与其生存环境之间复杂的响应格局及其遗传机制 (Kammen-ga *et al.*, 2007), 加深在生态本质上理解生物与环境之间的相互作用。

研究基因表达谱变化特征的方法主要有: 差异显示技术 (mRNA differential display-PCR,

DD-PCR)、代表性示差分析 (cDNA-representational difference analysis-PCR, RDA-PCR)、抑制消减杂交 (suppressive subtractive hybridization, SSH)、表达序列标签 (expressed sequence tags, EST)、基因表达连续分析 (serial analysis of gene expression, SAGE) 以及基因芯片 (gene chips, microarrays)。

(1) mRNA 差异显示技术 (DD-PCR): 1992 年, 美国 Dena-Farber 癌症研究所的两位科学家 Liang 和 Pardee 建立了一种用于分离和克隆哺乳动物正常与异常细胞之间差异表达基因的 PCR 方法 (Liang and Pardee, 1992), 应用此法可以了解不同细胞或同类细胞在不同发育阶段、不同生理状态下的基因表达情况, 为研究生命活动过程提供重要信息。该方法的基本原理是: 真核细胞的 mRNA 含有 poly (A) 末端, 在 poly (A) 前面的 2 个碱基有 12 种可能的组合: 前面第一个 (M) 有 G、C、T 三种可能, 第二位碱基 (N) 有 G、C、T、A 四种可能, 因此 3' 端引物为 Oligo-dT<sub>12</sub>MN (M、N 分别代表 G、C、T、A 四种碱基的一种, 其中 M 不能为 A), 共 12 种引物。当用任何一种 oligo-dT<sub>12</sub>MN 对 mRNA 进行反转录, 即可得到 1/12 的 cDNA。为获取 cDNA 最大程度的 PCR 扩增, 5' 端引物设计成一组随机引物, 随机地结合在来自 mRNA 的 cDNA 上。由于结合是随机的, 因此片段的大小也是不同的, 这样正常与异常细胞间存在差异表达的 cDNA 片段可以通过 DNA 测序凝胶电泳显示出来, 经过 Northern 杂交分析确证后, 这些差别显示的 cDNA 可以作为探针, 用于进一步分离 cDNA 及基因组克隆, 达到最终分离基因的目的, 理论上可以获得几乎所有 mRNA 的特异扩增片段 (黄留玉, 2005)。

mRNA 差异显示技术 (DD-PCR) 可以比较多种细胞类型, 表现多个差异; 同时检测基因的上调和下调表达; 样品 RNA 用量少; 灵敏度较高, 可以检测组织细胞中丰度较低的 mRNA; 实验周期短, 便于重复等优点。

王亚玲运用 DD-PCR 分析植物病原菌诱导基因表达时, 分离到一个受病原菌侵染诱导的水稻 cDNA 片段。该片段包含 7 个 P450CYP72A 基因的基因簇保守部分 (王亚玲等, 2003)。Macaluso 等应用此技术研究了病原体 *Rickettsia* 侵染和非侵染扁虱 (*Dermacentor variabilis*) 的基因表达差异, 更清楚地认识了与病原菌侵染响应相关的遗传因子 (Macaluso *et al.*, 2003)。Neelima 和 Rao 通过 DD RT-PCR 的方法检测了毛喉素诱导体外 BeWo 细胞分化后的基因表达谱变化 (Neelima and Rao, 2007)。

但是这种方法存在 PCR 竞争的问题, 不能检测由靶细胞合成的全部 cDNA; 它的应用还受到凝胶电泳分子量的限制, 同时假阳性较高 (黄留玉, 2005)。

(2) 代表性示差分析技术 (RDA-PCR): 代表性示差分析的基本原理是用 4 个碱基的内切酶酶切靶方和驱动方 cDNA, 以过量的驱动方 cDNA 与靶方 cDNA 杂交 3 次, 通过多次变换 cDNA 两端接头, 再用 PCR 指数扩增出双链的特异目的基因 (刘文荣等, 2006)。它是在 Lisitsyn 等的基因组 DNA 示差分析技术基础上经过 Hubank 等改进而成的方法 (Lisitsyn *et al.*, 1993; Hubank *et al.*, 1994)。其特点是将 PCR 技术与差减杂交技术相结合, 通过 PCR 作用选择性扩增目的片段, 具有更高的富集效率, 可以扩增到的 cDNA 代表着全基因组的信息, 且假阳性低 (董霞等, 2006)。Andersson 等应用 RDA 技术筛选了差异表达基因 (Andersson *et al.*, 2003)。Zoldos 等应用 RDA-PCR 技术比较了亲缘关系近的橡树树种之间基因表达谱的差异 (Zoldos *et al.*, 2001)。Woyke 等应用 mRNA 代表性示差分析与 RT-PCR 技术相结合发现, 病原体 (*Cryptococcus neoformans*) 的细胞转录组基因中有接近 60% 的基因在 PHE (抗真菌五肽) 胁迫下表达发生了变化 (Woyke *et al.*, 2004)。但是此种技术存在富集片段短, 检出低丰度 mRNA 受限的缺点。

(3) 抑制消减杂交技术 (SSH): 此技术是 1996 年由 Diatchenko 等在差异显示 PCR 法的基



基础上建立起的抑制性扣除杂交技术,它是一种比较和分离不同组织间或同一细胞系、同一组织在不同条件下差别表达基因的方法(Diatchenko *et al.*, 1996)。消减抑制杂交中两个关键技术是消减杂交和抑制 PCR。该方法运用了二级动力学原理,即丰度高的单链 DNA 在退火时产生同源杂交的速度快于丰度低的单链 DNA,从而使原来在丰度上有差别的单链 DNA 相对含量达到基本一致。而抑制 PCR 则是利用链内退火优于链间退火的特点,使非目的片段两端反向重复序列在退火时产生类似发夹的互补结构,无法作为模板与引物配对,从而选择性地抑制了非目的基因片段的扩增。这样既利用了消减杂交技术的消减富集,又利用了抑制 PCR 技术进行了高效率的动力学富集(黄留玉, 2005)。其具有特异性强,假阳性低,灵敏度高,程序相对简单,操作方便等特点。一次反应可以同时分离上百个差异表达基因,是一种高效的筛选方法。

周津等将 SSH 技术和 Northern 杂交技术相结合成功地分离了食道癌中的 8 个差异表达基因(周津等, 2001)。Zinser 等为了研究小麦对 UV-B 的具体响应,应用 SSH 技术分离被诱导表达的基因,发现了 13 个 UV-B 诱导上调表达基因(Zinser *et al.*, 2007)。Nobile 等应用此技术研究了 *Cercosporidium personatum* 侵染条件下不同基因型花生基因表达谱的变化(Nobile *et al.*, 2008)。虽然该方法具有上述优点,应用较广,但是不可否认它也存在某些不足,主要表现为要求的起始材料多,不能同时进行多个材料的比较,得到差异表达片段还需要扩增其全长序列。

以上三种方法都是建立在 PCR 基础上,实验者对自己感兴趣的基因片段进行筛选,克隆,测序或者应用其他方法如 Northern 杂交、荧光定量 PCR、半定量 PCR 等对所选基因进行分析,个人主观性较大,而且不能检测到低丰度的基因。

(4) 表达序列标签技术(EST):此技术在 1991 年首次被 Adams 等人提出(Adams *et al.*, 1991)。EST 是长约 150~500bp 的基因表达序列片段,EST 技术是将 mRNA 反转录成 cDNA 文库后,大规模随机挑选 cDNA 克隆,对其 5'或 3'端进行一步法测序,所获序列与基因数据库已知序列比较,从而获得对生物体生长发育、繁殖分化、遗传变异、衰老死亡等一系列生命过程认识的技术(于凤池, 2005)。

EST 技术基本步骤为:①构建 cDNA 文库;②随机挑选 cDNA 克隆;③每个克隆从 5'或 3'端进行一次测序;④与同种或异种生物已知的核酸和蛋白质数据库进行比较分析;⑤在基因库中登记新基因及未知基因(陈其军等, 2001)。

由于该技术具有简便、快速、节省费用、效率高的优点,为寻找新基因和未知基因提供了一种高效的工具,被广泛用于基因表达谱的研究之中。例如,人们发现 *Mesembryanthemum crystallinum* 可以在盐胁迫或缺水的条件下由 C<sub>3</sub>型光合作用植物转变为 CAM 型植物,CAM 途径可以在缺水胁迫条件下通过改变 CO<sub>2</sub>的吸收途径更有效地固定 C,从而减少蒸腾作用丧失的水分。Kore-eda 等应用 EST 技术研究了盐胁迫和水分充足条件下,该植物叶片组织基因表达谱的变化,更清楚地揭示了 CAM 途径和其他盐胁迫响应的分子遗传基础和调控机制(Kore-eda *et al.*, 2004)。Keilin 等利用此技术通过分析葡萄休眠芽的基因表达谱变化,发现与氧胁迫, Ca<sup>2+</sup>信号转导, C 代谢的厌氧模式相关的基因在葡萄休眠芽解除休眠的调节和完成过程中发挥着重要的作用(Keilin *et al.*, 2007)。但是基因表达谱中的 EST 技术不能检测到低丰度的基因。

(5) 基因表达连续分析(SAGE):这是由 Velculescu 等 1995 年最先建立的技术(Velculescu *et al.*, 1995)。主要基于两个原理:一是在转录物特定定位点上一段 9~10 bp 寡核苷酸序列可代表此转录物的特异性。理论上随机排列的 9 bp 片段可区分 4<sup>9</sup>种转录物。二是将多个短序列标签串连在一个克隆中,通过测序以连续的方式同时分析多个标签及其代表的转录子,明显提高了分析效率(史春梦等, 2001)。这种方法主要的优点在于一次可以对大量的转录产物进行定量定性分

析,找到新的基因,同时该方法可用来分离在不同发育阶段和生理状态下差别表达的基因,检测不同细胞间已知基因表达的具体差异,建立较全面的基因表达谱,系统分析基因表达差异,对低丰度表达的基因有较好的检测效果。所以 SAGE 技术被大量应用于生物生命周期的不同阶段、不同年龄阶段的基因表达谱变化 (Williams *et al.*, 2007; Popesco *et al.*, 2007), 以及生物在冻害和病毒侵染等胁迫条件下基因表达谱变化 (Jung *et al.*, 2003; Fregene *et al.*, 2004) 的研究中。但是基因表达连续分析的工作量非常大,有大量的测序和计算机分析任务,费用昂贵,而且假阳性高 (刘文荣等, 2006)。

尽管上述方法都能获得部分基因的差异表达模式 (见表 1), 但不能获得全部基因的基因表达谱信息。相比而言,基因芯片技术具有高通量,相对节约经费,避免使用大量实验材料等优点,灵敏度相对更高,因此现在对基因表达谱的研究应用最广泛的是基因芯片技术。

## 1.2 基因芯片技术

基因芯片技术是将大量核酸片段以预先设计的方式固定在载玻片、尼龙膜、玻璃等载体上组成密集分子排列,通过与标记样品进行杂交,检测杂交信号的强弱,从而判断样品中靶分子的数量组成 (王廷华等, 2005; Wang, 2000)。基因芯片技术给基因功能研究提供了一个新的契机,它自 1989 年由 Southern 提出后,即受到多方的重视和广泛的利用,被评为 21 世纪最有发展前途的 20 项高新科技之一。

基因芯片发展到现在,技术已经相当完善。采取光刻合成探针,精确度更高,重复性更好。最先研究完善的基因芯片是基因组较小,分子数据资料较为完整的物种,如酵母等。基因芯片的分类方式较多,根据储存的生物信息类别,可以分为寡核苷酸芯片和 cDNA 微阵列。按照用途基因芯片可以分为:测序芯片,表达芯片和诊断芯片。根据芯片的制备方式可以将其分为两大类:原位合成芯片和 DNA 片段排列在固相载体上的芯片。用于基因表达谱研究的芯片属于表达芯片,大多数为 cDNA 基因组表达谱芯片。

基因芯片技术的应用根据其制备方式主要有两种,其一是点样法。应用各种方法筛选大量差异表达基因,通过回收,测序确定基因,再将这些标记基因固定在支持物上与样品 DNA 进行杂交,从而得到基因表达谱的变化。刘桂丰等根据已经构建的星星草 cDNA 文库制备了基因芯片用于研究  $\text{NaHCO}_3$  胁迫下星星草基因表达谱的变化 (刘桂丰等, 2005; 杨传平等, 2005); 毛伟华等通过在基因库中筛选某些代谢相关的基因,引用 RT-PCR 扩增 cDNA 片段,通过克隆、测序,制作黄瓜的 cDNA 基因芯片,从而研究了黄瓜在缺镁胁迫下基因的差异表达 (毛伟华等, 2006)。基因芯片技术也可以根据以前报道过的基因,提取 RNA 合成荧光标记的 cDNA 探针,然后固定在特定支持物上,与样本杂交,从而得到基因表达谱的信息。应用这种方法田哲贤等比较了根瘤中苜蓿根瘤菌的 *nifA* 突变菌株和野生菌株的基因表达谱 (田哲贤等, 2006); Hernández 等利用已报道过的植物 EST 序列,以尼龙渗透膜为载体合成 cDNA 芯片,通过杂交发现代表不同功能类别的 126 个基因在对 P 的响应中,基因表达具有明显的差异,其中 62% 的基因是由于缺 P 所导致的 (Hernández *et al.*, 2007)。

另一种方法就是采用原位光刻杂交方法制成的商品化基因芯片。这是现在被认为最可信的技术,主要集中在与人类疾病相关的基因芯片和微生物芯片上,在植物方面已经商品化的芯片包括拟南芥、小麦、玉米等。商品化基因芯片的基本制作过程及其在基因表达研究中的大致操作过程如图 1 所示 (Aharoni and Vorst, 2001; B 图略作补充)。很多学者利用基因芯片对胁迫条件下拟南芥、果蝇等生物在转录水平上基因表达谱的变化进行了研究 (Chen *et al.*, 2003; Kovalchuk *et al.*, 2005; Girardot *et al.*, 2004)。



表 1 基因差异表达研究的几种主要技术  
Table 1 The several technologies in the study of differentially expressed genes

方法	作者及年代	主要原理	优点	缺点	参考文献
mRNA 差异显示技术 (DD-RT PCR)	Liang and Pardee, 1992	mRNA 的 poly (A) 前面 2 个碱基有 12 种可能的组合, 当用任何一种 oligo - dT <sub>12</sub> MN 对 mRNA 进行反转录, 即可得到 1/12 的 cDNA。利用 5' 端引物设计成一组随机引物, 随机地结合在 cDNA 上。随机结合使片段的大小不同, 这样正常与异常细胞间差异表达的 cDNA 片段可以通过 DNA 测序凝胶电泳显示出来, 理论上可以获得几乎所有 mRNA 的特异扩增片段。	比较多种细胞类型, 表现多个差异; 同时检测基因上调和下调的表; 样品 RNA 量少; 灵敏度较高, 检测组织细胞中丰度低的 mRNA; 实验周期短, 便于重复	这种方法存在 PCR 竞争的问题, 不能检测由靶细胞合成的全部 cDNA; 同时还有受到凝胶电泳分子量的限制和假阳性较高的缺点	Liang and Pardee, 1992 黄留玉, 2005 王亚玲等, 2003 Macaluso <i>et al.</i> , 2003 Neelima and Rao., 2007
代表性差异分析技术 (RDA-PCR)	Listyn <i>et al.</i> , 1993	4 个碱基的内切酶切靶方和驱动方 cDNA, 以过量的驱动方 cDNA 与靶方 cDNA 杂交 3 次, 通过多次变换 cDNA 两端接头, 再用 PCR 指数扩增出双链的特异目的基因。	扩增目的片段具有更高的富集效率; 假阳性低	存在富集片段短, 低丰度 mRNA 检出受限的缺点	Hubank <i>et al.</i> , 1994 刘文荣等, 2006
抑制消减杂交技术 (SSH)	Diatchenko <i>et al.</i> , 1996	该方法的关键技术是消减杂交和抑制 PCR。运用了二级动力学原理, 使原来在丰度上有差别的单链 DNA 相对含量达到基本一致。抑制 PCR 利用链内退火优于链间退火的特点, 使非目的片段两端反向重复序列在退火时产生类似发夹的互补结构, 从而选择性地抑制了非目的基因片段的扩增。	具有特异性强, 假阳性低, 灵敏度高, 程序相对简单, 操作方便的特点。一次反应同时分离上百个差异表达基因, 是一种高效的筛选方法。	要求的起始材料多, 不能同时进行多个材料的比较, 得到差异表达片段还需要扩增其全长序列	黄留玉, 2005 Zinser <i>et al.</i> , 2007 Nobile <i>et al.</i> , 2008
表达序列标签技术 (EST)	Adams <i>et al.</i> , 1991	典型的 mRNA 分子的 5' 端转录非翻译区和 3' 端转录非翻译区都是特定的, 即每条 cDNA 的 5' 端或 3' 端的有限序列即可特异性地代表生物体某种组织的某个时期的一个表达基因。某一组织的足够数量的 EST 即可代表某组织的基因表达情况。	该技术具有简便、快速、节省费用、效率高、为寻找新基因和未知基因提供了一种高效的工具	EST 技术不能检测到低丰度的基因	Adams <i>et al.</i> , 1991 于凤池, 2005 Kore-eda <i>et al.</i> , 2004 Keilin <i>et al.</i> , 2007
基因表达连续分析 (SAGE)	Velculescu <i>et al.</i> , 1995	在转录物特定位点上一段 9 ~ 10 bp 序列可代表此转录物的特异性。理论上随机排列的 9 bp 片段可区分 4 <sup>9</sup> 种转录物; 将多个短序列标签串连在一个克隆中, 通过测序以连续的方式同时分析多个标签及其代表的转录子, 明显提高分析效率。	大量进行定量性分析, 找到新基因, 系统分析基因表达差异, 对低丰度表达的基因有较好的检测效果	工作量非常大, 有大量的测序和计算机分析任务, 费用昂贵, 而且假阳性高	史春梦等, 2001 Williams <i>et al.</i> , 2007; Popesco <i>et al.</i> , 2008

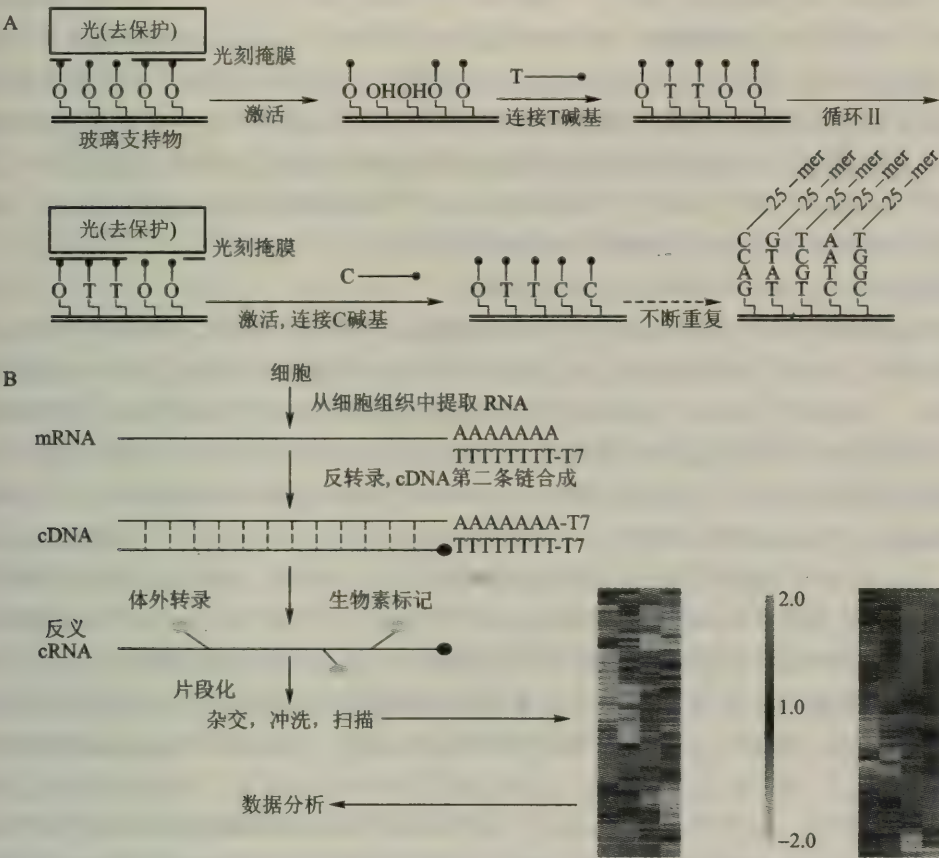


图 1 基因芯片的基本制作方法和基因表达谱研究中的大致操作过程

A. 基因芯片探针合成; B. 基因表达谱研究的操作过程

Fig. 1 Basic production of microarrays and the main operation in gene expression studies.

A. Probes synthesize on glass substrate of microarray. B. The operation steps of the study about gene expression profiling by microarrays

2. 基因表达谱和基因芯片在生态毒理学中的应用

2.1 基因表达谱与生态毒理学的结合

生态毒理学是研究有毒有害物质对种群、群落和生态系统产生的生态学和毒理学影响及污染物在环境中命运的科学（秦占芬和徐晓白，2006）。生物在逆境条件下通过基因表达模式的调整来适应环境的改变。Shinozaki 等认为大量的基因与非生物胁迫响应有关，这些基因不仅被认为有直接保护细胞、抵抗环境胁迫的功能，还与非生物胁迫下基因表达的调节和信号转导有关（Shinozaki *et al.*，1997）。逆境条件引起生物生长性状的响应往往是多基因共同作用的结果（段昌群，1995），所以有必要对逆境条件下生物的基因表达谱变化进行研究，从而可以了解到全部已知基因在逆境条件下的表达差异，真正理解生物响应的方式。1999 年利用基因芯片技术研究的基因表达谱变化被提出用于毒理学的研究之中，主要可以用于以下方面：①通过基因表达的网络系统，确定环境污染物的可能作用机制；②通过已经确定机理的有毒物质与未知毒物之间分子特



征的关系, 确定未知毒物的作用模式; ③作为化学污染生物标记, 估计毒物诱导的基因表达; ④在受到具体污染物污染的物种中, 确定基因表达的重复模式; ⑤利用物种之间的作用推断该毒物对另一物种的作用; ⑥确定复杂化合物的生物学效应; ⑦比较急性污染和慢性污染的效应关系; ⑧确定遗传多态现象; ⑨估计在污染物胁迫条件下改良敏感个体中遗传多态性的重要性; ⑩通过基因表达谱的变化揭示自然种群的胁迫响应和在环境中起重要作用的生态因子 (Afshari *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2002)。总的来说, 基因芯片技术的不断发展以及人们对基因表达信息变化的了解需求使其在生态毒理学中得到广泛的应用。

## 2.2 基因表达谱与生物对不同污染物的响应机制

生存在逆境环境下的生物在细胞水平上感应到胁迫后开始启动响应, 刺激信号转导途径, 引起基因表达模式的改变, 进而导致代谢、生理上的响应。据估计, 高等生物中大约有  $10^5$  个基因, 但在每一个细胞中只有约 15% 在表达, 正是这种基因表达水平及模式的变化控制着生物体的整个生命过程及其代谢变化。所以生物对胁迫的响应是一个非常复杂的过程, 不同的胁迫会引起不同基因表达模式的变化。生物对不同污染物的响应机制也因此而有所不同。Chen 等研究发现在五种胁迫条件 (氧胁迫、镉胁迫、热刺激、渗透胁迫和 DNA 损伤) 下裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 在转录水平上具有不同的响应方式 (Chen *et al.*, 2003)。Reichert 和 Menzel 通过基因芯片研究土壤线虫 *Caenorhabditis elegans* 在五种化合物污染  $48 \pm 5$  小时后的基因表达谱变化发现诱导表达的基因只有 26 个在两种以上胁迫条件下同时表达, 其余各不相同, 并通过不同途径相关基因分析证明了生态毒理学中生物基因表达模式的改变是对不同污染物响应的结果 (Reichert and Menzel, 2005)。Girardot 等研究果蝇在除草剂、过氧化氢引起的氧胁迫以及衣霉素导致的内质网胁迫下基因表达谱的变化, 发现在相同的影响效应条件下基因组的变化高度依赖于胁迫物质的本身特性, 如在除草剂  $5 \mu\text{mol/L}$  条件下有 7% 的基因表达发生变化, 而  $\text{H}_2\text{O}_2$  仅有 0.7% (Girardot *et al.*, 2004)。Kovalchuk 等研究拟南芥在重金属镉和铅污染条件下植株大小, 根长, 金属含量以及基因表达谱变化, 结果表明植物对两种重金属具有相同的响应机制 (Kovalchuk *et al.*, 2005)。虽然生物对同一类污染的响应机制大致相同, 但是研究显示不同的基因对不同的重金属响应存在差距。重金属污染下拟南芥基因表达调节在数量上存在差异, 所以 Cd 的遗传毒性大于 Pb 的毒性 (Kovalchuk *et al.*, 2005)。Caulobacter crescentus 对重金属镉、铬、铀最主要的响应方式都是抗氧化胁迫, 但基因表达种类和量上存在差异, 如 SodA 在重金属镉、铬、铀胁迫条件下表达上升的量存在差异; 而 SodB 仅在 Cd 污染条件下上升表达 2 倍; SodC 在正常情况下表达与重金属污染条件下表达相同 (Hu *et al.*, 2005)。

## 2.3 生物的种类、基因型差异与胁迫环境的基因表达谱差异

不同生物的性别及同一生物的不同细胞、不同基因型由于外部形态及内部结构不一致, 基因选择性表达的基础也不同, 导致生物对胁迫环境的响应方式存在差异。

(1) 基因表达受到生物的不同性别的影响, Williams 等利用表达谱芯片研究欧洲雌性和雄性比目鱼对污水的胁迫响应机制 (Williams *et al.*, 2003), 结果表明在污染和非污染条件下雄性比目鱼中有 11 个基因表达发生变化, 在雌性中可能由于个体差异等原因而无显著差异。

(2) 同一生物的不同组织器官对胁迫响应不同。Rosen 等应用基因芯片研究小鼠胎儿在 PFOA 胁迫下肝脏和肺的基因表达谱变化, 发现与脂肪酸分解代谢相关的基因在两种器官中的表达均被改变, 但是小鼠胎儿肝脏中基因表达发生更剧烈的变化, 与脂质运输, 生酮作用, 糖代谢, 脂代谢, 胆固醇生物合成, 类固醇代谢, 磷脂代谢等生物化学途径相关的基因表达均被调节 (Rosen *et al.*, 2007)。不同器官对不同污染浓度的响应也存在差异, 如苯、三氯乙烯、甲基汞

三种复合污染在老鼠肝脏中仅有最低可见不利效应浓度水平的基因表达改变,而在肾脏中的基因表达改变同时也发生在低于最低可见不利效应浓度水平 (Hendriksen *et al.*, 2007)。

(3) 即使是同一部位的不同细胞类型对胁迫表达的响应也有所不同。在  $0.1 \mu\text{L/L O}_3$  胁迫下,老鼠齿槽上皮细胞 type II 和 type I-like 细胞基因表达谱的变化显示前者在 24 h 处理后 mRNA 变化大于 4 h,影响细胞代谢、适应和修复过程;后者在 4 h 时基因表达变化量较大,影响早期胁迫响应。且前者表达更多的抗氧化物基因,对氧胁迫具有更高的抗性 (Wang *et al.*, 2006)。Swindell 等通过拟南芥在九种胁迫条件下基因表达谱的变化发现植物对不同胁迫的响应受到器官类型的影响 (Swindell, 2006)。在  $5 \mu\text{mol/L}$  和  $50 \mu\text{mol/L Cd}$  胁迫下拟南芥根中分别有 5% 和 10% 的基因表达发生变化,而叶中表达变化的基因量则为 3% 和 3.9%;同一浓度 Cd 污染下拟南芥不同部位根和叶基因差异表达的数量也不同,高浓度  $50 \mu\text{mol/L Cd}$  处理 30 h 根中 2 000 个基因表达受到调节,而在叶中仅有 768 个基因被调节表达 (Herbette *et al.*, 2006)。

(4) 不同基因型的生物对胁迫的响应存在差异。绿色 bpl 基因型和紫色 BPl 基因型玉米被用于无紫外线 UV-B 光照的响应分析,通过芯片杂交分析数据显示绿色 bpl 基因在经过清除 UV-B 的光照射后,延长因子  $1\alpha$  和核糖体蛋白 QM 基因下降,MRP33 和 MPR47 基因上调表达 4 倍以上,而紫色 BPl 基因型玉米对这种胁迫条件的响应基因表达变化不明显 (Casati *et al.*, 2003)。在 *Nrf* 损伤型 (*Nrf2*<sup>-/-</sup>) 和野生型 (*Nrf2*<sup>+/+</sup>) 的小鼠肺脏对氧胁迫响应的研究中发现基因表达谱存在差异。表达被改变的基因数量 (包括抗氧化酶和免疫细胞受体相关的基因) 在野生型小鼠中比 *Nrf2*<sup>-/-</sup> 型中多。而且氧胁迫诱导的上调基因,如抗氧化和防卫基因 (*Txnrd1*, *Ex*, *Cp-2*) 和其他新基因 (*Pkc-a*, *Tcf-3*, *Ppar-c*) 的表达在野生型中也显著高于 *Nrf* 损伤的小鼠中 (Cho *et al.*, 2005)。

#### 2.4 基因表达谱对胁迫的响应受时间尺度的调节

胁迫的响应时间是生态毒理学长期关注的一个因子,不同的响应物质在不同时间内发挥的作用存在差异 (Hisashi, 2001)。任何化学物质的毒性特征都依赖于污染物的作用方式、剂量和作用时间,生物基因表达模式也受到这些变量的影响 (Neumann *et al.*, 2002)。老鼠的肺脏经过 2 h, 8 h 和 18 h 除草剂胁迫后,基因表达谱最大的变化发生在 2 h 胁迫条件下,表明在转录水平上肺脏对除草剂的响应是快速的 (Mainwaring *et al.*, 2006)。Yoneda 等应用基因芯片技术检测到在不同时间阶段的氧化胁迫条件下,人类支气管上皮细胞的基因表达具有明显的时间调节特征。在  $\text{H}_2\text{O}_2$  或烟胁迫 1 h 后抗凋亡相关基因的表达被诱导 (Yoneda *et al.*, 2001)。

研究表明植物对不同类型胁迫的基因表达响应受时间尺度的强烈影响 (Swindell, 2006)。不同时间 Cd 处理条件下拟南芥基因表达数据显示在不同的时间点上很少有基因相同,在 3 个时间点上,  $5 \mu\text{mol/L Cd}$  处理根中基因表达变化量是 1 092 个,其中 48 个 (4.3%) 相同,暗示 Cd 处理的不同时间段植物有短暂性的响应差异,而不同浓度处理条件下表达差异基因相同的可以达到 36%,显示植物对 Cd 的响应的基因表达调节作用主要是时间效应,而不是剂量效应 (Herbette *et al.*, 2006)。

#### 2.5 通过基因表达谱的变化可以判断不同污染物的作用方式

生物在对胁迫环境的响应过程中,污染物本身的性质是重要的影响因子。不同的污染物对生物的伤害方式是不同的,有些能够直接对生物产生毒害作用,而有些则是通过破坏细胞膜的完整性等间接对生物产生毒害。基因表达谱有助于鉴定有毒物质的可能毒理学作用机制 (Tully *et al.*, 2006)。

Kovalchuk 等研究了在重金属 Pb 和 Cd 污染条件下基因表达,变化结果推断出 Pb 和 Cd 对植



物可能具有相同的作用方式,但是 Cd 比 Pb 具有更大的遗传毒性 (Kovalchuk *et al.*, 2005)。Hendriksen 等发现老鼠肝脏和肾脏的很多基因在苯、三氯乙烯、甲基汞三种或两种复合污染下被诱导表达,而在单一污染条件下则无变化,如肝脏中 *Id2*, *Nr2f6*, *Tnfrsf1a*, *Ccng1*, *Mdm2* 和 *Nfkb1*, 由此推测复合污染响应比单一污染响应具有更大的遗传胁迫响应机制 (Hendriksen *et al.*, 2007)。通过 1-甲基-4-苯基吡啶盐 ( $MPP^+$ ) 胁迫下神经细胞 MN9D 的基因表达谱变化, Wang 等发现多种途径与  $MPP^+$  诱导的毒性效应有关,包括程序性细胞死亡,氧胁迫,金属结合,细胞代谢和信号转导途径;推测  $MPP^+$  诱导的毒性效应与 PD 发病机理具有共同的分子机制 (Wang *et al.*, 2007)。

## 2.6 更多与胁迫相关的新基因被发现

基因芯片技术与其他方法相比,可以得到大量数据,通过基因表达变化更容易发现与胁迫相关的功能基因。Wang 等应用 cDNA 芯片监测了被高盐胁迫后玉米根中转录组的行为变化特征,发现 NaCl 胁迫下与盐激反应相关的新基因 (Wang *et al.*, 2003)。Casati 等通过基因表达分析发现在紫外辐射响应中未经证实的功能基因 (Casati *et al.*, 2003)。在研究不同基因型小鼠对氧胁迫的响应中,Cho 等发现与胁迫响应相关的新基因,如 *Pkc-a*, *Tcf-3*, *Ppar-c* 等 (Cho *et al.*, 2005)。

虽然生态毒理学中生物对胁迫环境基因表达谱变化的影响被研究得较多,但是在自然条件下应用基因表达谱的研究极少,大多数都是在限定的环境下进行的研究。原因是个体水平的差异、技术水平的差异、分类水平的差异 (Kammenga *et al.*, 2007), 以及广泛的生物多样性和各种复杂的环境因子都会影响基因的表达,而且对数据的分析具有一定的困难。目前只有自然生态系统——Tinto River (Spain) 两个样点中的铁氧化细菌 *Leptospirillum ferrooxidans* 基因表达谱的变化被研究 (Victor *et al.*, 2007)。两个样点存在 pH、温度、盐分、含氧量、金属含量及矿质元素含量等众多胁迫条件差异,通过对氧胁迫、盐胁迫响应等途径基因表达的变化分析,证明了基因芯片在环境样品中研究基因表达谱的可利用性。

## 2.7 生态毒理基因组学的提出与发展

Neumann 等认为毒理基因组学的产生影响了毒理学的几个领域包括生态毒理学,将毒理基因组学的技术用于评估污染物对生态系统健康的影响,从而产生新的学科——生态毒理基因组学 (Neumann *et al.*, 2002); 2004 年 Snape 等根据以人类为研究对象的毒理基因组学的定义提出生态毒理基因组学的定义:在环境污染物胁迫响应中,对具有重要作用的非目标生物体中的基因和蛋白质表达的研究 (Snape *et al.*, 2004)。随着分子生物学技术的不断发展,尤其是基因芯片技术的应用,生态毒理基因组学技术得到了广泛的应用。可以用于生物对污染物响应途径和基因在不同污染条件下的表达变化的研究之中。污染物对生物体影响研究的传统方法是对整个生物体响应的测定,如死亡率、生物量等,但是这些方法对生物应对污染物胁迫的响应机理的理解提供的信息很少,生态毒理基因组学为更好地理解化学污染物在不同生物种中的分子生态机制提供了强有力的工具。结合基因组学、生理学和生态学的方法研究生物对环境胁迫的响应可以帮助我们更好地理解生理学上的多态性,生物如何占据较大的生存空间范围,拥有较宽的生态幅度,以及生态系统中生物之间的相互作用 (图 2)。

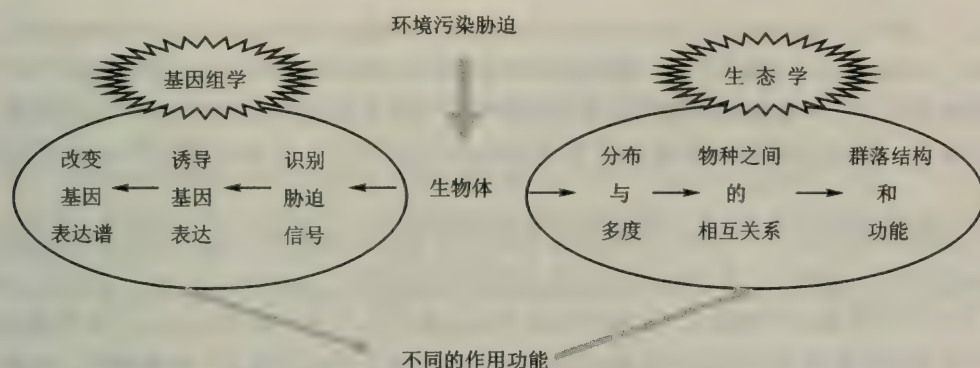


图2 基因组学、生理学与生态学在环境污染胁迫响应中的结合应用

Fig.2 The integration of genomics, physiology and ecology in the study of the organisms' response to environmental contaminations.

### 3. 问题与展望

#### 3.1 存在问题

在生态毒理学中,应用基因芯片研究基因表达谱的变化除了受基因芯片本身具有未知新基因和未鉴定基因影响外,还受到以下几方面的限制:

(1) 基因芯片技术本身的限制,如芯片制作过程中出现的偶然误差以及繁杂的样品制作中的错误。

(2) 基因芯片由于含有大量的基因信息,这些信息的获得付出了艰苦的劳动,所以价格比较昂贵。

(3) 生态毒理学研究中受到很多因素的影响,如自然条件下众多的环境因子,种群的年龄、性别、遗传多态性和生物个体间的差异等,使基因表达水平具有多变的特点。

(4) 物种限制,物种在基因表达水平上数据的缺乏,致使基因芯片的种类有限,所以在研究中,物种的选择受到了限制(Lettieri, 2006)。

(5) 基因芯片的发展迅速,精确性、重复性等不断的提高,使以前应用此技术的数据结果和现在所获得的结果相比较存在不可信。

(6) 基因芯片提供的大量数据存在分析上的困难,对实验数据进行基因表达量上升、下降的数量变化统计及归类并不能清楚地理解基因在胁迫环境下发挥的重要作用。

虽然应用基因芯片研究基因表达谱的变化存在本文所述的众多限制,但是由于传统基因表达的研究方法已远远满足不了人们了解基因组水平表达模式的需要,限制了对生物在胁迫环境下适应机制的全面理解,而基因芯片技术研究的基因表达谱变化正是一种高通量、快速的方法,为研究基因表达提供了一个强有力的工具,所以在生态毒理学领域中应用这一技术研究基因表达谱将势在必行。

#### 3.2 展望

目前基因芯片技术在生态毒理学中主要用于研究生物对污染物的响应,随着技术本身的不断发展,实验设计的不断完善以及基因表达水平上数据的不断积累,在生态毒理学中,未来应用基因芯片技术研究基因表达谱变化将可能应用于以下几个方面。

(1) 污染物之间的相互作用:目前大多数研究集中在单一污染条件下基因表达谱的变化



(Seki *et al.*, 2001; Herbette *et al.*, 2006) 或几种污染之间的基因表达变化相关分析 (Seki *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003) 上。但是各种污染物对生物体的污染不可能是独立存在, 互不干扰的, 在自然条件下仅一种胁迫的条件是不可能存在的。通过基因表达研究几种污染同时存在时基因表达谱变化, 揭示污染物相互作用下基因表达模式的改变, 有利于理解污染物之间的相互作用。

(2) 污染物的剂量效应关系: 任何化学物质的毒性特征都依赖于其本身的作用途径、剂量和作用持续时间, 基因表达模式的改变也受这些变量的影响 (Neumann *et al.*, 2002)。Herbette 等 2006 年的研究数据显示植物对 Cd 响应的基因表达调节作用是时间效应, 而不是剂量效应。这是基因表达谱研究数据分析的一个新方式, 为基因表达响应研究提供了一种新视野, 实验结论是在 5  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 两个处理条件适用的。一些学者研究植物对不同 N 水平响应的基因表达谱的变化, 发现适度 N 胁迫下只有小部分基因表达发生显著性变化, 而严重 N 胁迫条件下则有大量与生物过程相关的基因表达发生变化 (Bi *et al.*, 2007)。Girardot 等通过对不同类型之间基因表达的相关性比较发现同一污染的不同浓度之间比不同污染之间具有更高的相关性, 推测转录水平基因变化可能依赖于剂量关系 (Girardot *et al.*, 2004)。对于基因表达模式的剂量效应关系研究应该按照 Hamadeh 和 Afshari 描述的剂量响应关系的模式 (Hamadeh and Afshari, 2004) 进行实验设计, 可以更明确地理解剂量效应关系, 剂量在基因表达上的确定, 尤其是效应浓度、半致死浓度等的确定对于污染治理, 生物适应具有重要的作用。

(3) 小剂量长期污染的基因表达谱变化: 可能由于小剂量污染研究需要持续较长的时间才能发现受害症状, 所以这方面的研究相对较少, 有毒物质的具体毒害机制和作用方式尚未十分清楚。目前文献中基因表达谱的研究都是在污染浓度高, 持续时间短 (大多数以小时计算, 极少数以星期为单位) 的条件下开展的, 没有发现对小剂量长期污染条件下基因表达谱的研究。了解小剂量长期污染下生物基因表达模式的改变, 有助于理解自然环境中生物体的适应方式, 以及慢性污染与急性污染之间的差异。

(4) 确定众多环境因子中主要污染物的种类: 一些学者认为可以通过重金属污染条件下某些特异性表达基因来检测重金属污染类型以及污染程度。如通过转基因大麦对重金属胁迫的响应——GUS 基因表达增强的长期研究, 认为转基因植物可以用一种生物标记来检测重金属污染 (Monciardini *et al.*, 1998), 提出了用基因表达指示污染物的新方法。日本学者 Azumi 发现 *Ciona* cDNA 芯片在 TBT 污染条件下有 200 多个与胁迫响应、解毒、氧化还原反应、生物合成和分解代谢有关的基因被强烈诱导表达, 提出 cDNA 芯片可以便利地分析 TBT 污染条件下全部基因的表达情况, 从而推测生物暴露于何种污染物以及污染的程度 (Azumi *et al.*, 2004)。胁迫环境下有多种基因表达发生变化, 生物学过程被不同的基因表达模式所调节 (Diatchenko *et al.*, 1996)。所以需要进一步了解各种污染物条件下基因表达模式, 制作含有特定基因表达模式的基因芯片, 大量显示基因表达的差异, 从而更精确地判断、指示环境中的污染物种类。

## 参考文献

- 陈其军, 王学臣, 刘强. 植物逆境胁迫耐受性功能基因组研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (6): 797-801.
- 董霞, 李文正, 刘世桂. 抑制消减杂交技术及其在植物基因表达研究中的应用 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42 (3): 515-522.

- 段昌群. 植物对环境污染的适应与植物的微进化 [J]. 生态学杂志, 1995, 14 (5): 43-50.
- 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 66-86.
- 刘桂丰, 褚延广, 王玉成等. cDNA 微阵列技术研究  $\text{NaHCO}_3$  胁迫下星星草基因表达谱 [J]. 西北植物学报, 2005, 25 (5): 887-892.
- 刘文荣, 张木清. 抑制性消减杂交技术在植物基因克隆中的应用 [J]. 亚热带农业研究, 2006, 2 (2): 66-71.
- 毛伟华, 龚亚明, 宋兴舜, 等. 黄瓜 cDNA 芯片的构建及其在黄瓜缺镁胁迫下基因差异表达研究中的应用 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (4): 767-772.
- 史春梦, 栗永萍. 全基因组基因表达频谱研究的新方法——SAGE 和 IPGI [J]. 生物工程进展, 2001, 21 (2): 65-67.
- 孙儒泳, 李庆芬, 牛翠娟等. 基础生态学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003, 1-3.
- 田哲贤, 邹华松, 李健等. *nifA* 突变的苜蓿根瘤菌在根瘤中的转录组学分析 [J]. 科学通报, 2006, 15: 1787-1793.
- 杨传平, 王玉成, 刘桂丰等. 基因芯片技术研究柞柳  $\text{NaHCO}_3$  胁迫下基因的表达 [J]. 生物工程学报, 2005, 2 (21): 220-226.
- 于凤池. EST 技术及其应用综述 [J]. 农业生物技术科学, 2005, 21 (2): 54-58.
- 秦占芬, 徐晓白. 非洲爪蟾在生态毒理学研究中的应用: 概述和实验动物质量控制 [J]. 科学通报, 2006, 51 (2): 873-878.
- 王廷华, 冯忠堂, Merlio J P. 分子杂交理论与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2000, 123-143.
- 王亚玲, 李群, 何祖华. 一个水稻 *P450CYP72A* 基因簇受病原菌诱导和发育及组织特异性表达 [J]. 科学通报, 2003, 48 (21): 2266-2270.
- 周津, 刘芝华, 王秀琴等. 抑制消减杂交及反 Northern 结合高通量筛选食管癌中差异表达基因 [J]. 科学通报, 2001, 46 (3): 222-226.
- ADAMS M D, KELLEY J M, GOCAYNE J D, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project [J]. Science, 1991, 252: 1651-1656.
- AHARONI A, VORST O. DNA microarrays for functional plant genomics [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 48: 99-118.
- ANDERSSON T, BORÄNG S, UNNEBERG P, et al. Shotgun sequencing and microarray analysis of RDA transcripts [J]. Gene, 2003, 310: 39-47.
- AFSHARI C A, NUWAYSIR E F and BARRETT J C. Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology and drug safety evaluation [J]. Cancer Research, 1999, 59: 4759-4760.
- AZUMI K, FUJIE M, USAMI T, et al. A cDNA microarray technique applied for analysis of global gene expression profiles in tributyltin-exposed ascidians [J]. Marine Environmental Research, 2004, 58: 543-546.
- BI Y M, WANG R L, ZHU T, et al. Global transcription profiling reveals differential response to chronic nitrogen stress and putative nitrogen regulatory components in *Arabidopsis* [J]. BMC Genomics, 2007, 8: 281.
- CASATI P and WALBOT V. Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content [J]. Plant Physiology, 2003, 132: 1739-1754.
- CHEN D, TOOME W M, MATA J et al. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress [J]. Molecular Biology of the Cell, 2003, 14: 214-229.
- CHO H Y, PEDDY S P, DEBIASE A, et al. Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury [J]. Free radical Biology & Medicine, 2005, 38: 325-343.
- DIATCHENKO L, CHRIS LAU Y F, COMPELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Biochemistry, 1996, 93: 6025-6030.
- FREGENE M, MATSUMURA H, AKANO A, et al. Serial analysis of gene expression (SAGE) of host-plant-resistance



- to the cassava mosaic disease (CMD) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56: 563-571.
- GIRARDOT F, MONNIER V, TRICOIRE H. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster* [J]. *BMC Genomics*, 2004, 5: 74 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender>.
- HAMADEH H K, AFSHARI C A. *Toxicogenomics Principles and Applications* [J]. A Jon Wiley & Sons, Inc., Publication, 2004, 3-4.
- HENDRIKSEN P J M, FREIDIG A P, JONKER D, et al. Transcriptomics analysis of interactive effects of benzene, trichloroethylene and methyl mercury within binary and ternary mixtures on the liver and kidney following subchronic exposure in the rat [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 225: 171-188.
- HERBETTE S, TACONNAT L, HUGOUVIEUX V, et al. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots [J]. *Biochimie*, 2006, 88: 1751-1765.
- HERNÁNDEZ G, RAMÍREZ M, VALDÉS-LÓPEZ O, et al. Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144: 752-767.
- HISASHI K N. 2001. Wounding stress induces alcohol dehydrogenase in maize and lettuce seedlings [J]. *Plant Growth Regulation*, 2007, 35: 285-288.
- HU P, BRODIE E L, SUZUKI Y, et al. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 8437-8449.
- HUBANK M, SCHATZ D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 5640-5648.
- JUNG S H, LEE J Y and LEE D H. Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52: 553-567.
- KAMMENGA J E, HERMAN M A, OUBORG N J, et al. Microarray challenges in ecology [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2007, 22 (5): 273-279.
- KEILIN T, PANG X Q, VENKATESWARI J, et al. Digital expression profiling of a grape-bud EST collection leads to new insight into molecular events during grape-bud dormancy release [J]. *Plant Science*, 2007, 173: 446-457.
- KORE-EDA S, CUSHMAN M A, AKSELROD, et al. Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *Gene*, 2004, 341: 83-92.
- KOVALCHUK I, TITOV V, HOHN B, et al. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead [J]. *Mutation Research*, 2005, 570: 149-161.
- LETTIERI T. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114: 4-9.
- LIANG P, PARDEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257: 967-971.
- LISITSYN N, LISITSYN N, WIGLER M. Cloning the differences between two complex genomes [J]. *Science*, 1993, 259 (5097): 946-951.
- MACALUSO K R, MULENGA A, SIMSER J A, et al. Differential expression of genes in uninfected and *Rickettsia*-infected *Dermacentor variabilis* ticks as assessed by differential-display PCR [J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (11): 6165-6170.
- MAINWARING G, LIM F L, ANTROBUS K, et al. Identification of early molecular pathways affected by paraquat in rat lung [J]. *Toxicology*, 2006, 225: 157-172.
- MONCIARDINI P, PODINI D and MARMIROLI N. Exotic gene expression in transgenic plants as a tool for monitoring environmental pollution [J]. *Chemosphere*, 1998, 37: 2761-2772.
- NEUMANN N F, GALVERZ F. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? [J]. *Biotechnology Advance*, 2002, 20: 391-419.
- NEELIMA P S, RAO A J. Gene expression profiling during Forskolin induced differentiation of BeWo cells by differential

- display RT-PCR [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 281: 37-46.
- NOBILE P M, LOPES C R, CAVALLARI C B, et al. Peanut genes identified during initial phase of *Cercosporidium peronosatum* infection [J]. *Plant Science*, 2008, 174: 78-87.
- POPESCO M C, LIN S, WANG Z et al. Serial analysis of gene expression profiles of adult and aged mouse cerebellum [J]. *Neurobiology of Aging*, 2008, 29 (5): 774-788.
- REICHERT K, MENZEL R. Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray [J]. *Chemosphere*, 2005, 61: 228-237.
- ROSEN M B, THIBODEAUX J R, WOOD C R, et al. Gene expression profiling in the lung and liver of PFOA-exposed mouse fetuses [J]. *Toxicology*, 2007, 239: 15-33.
- SHINOZAKI K, SHINOZAKI Y K. Gene expression and signal transduction in water stress response [J]. *Plant Journal*, 2002, 31: 279-292.
- SEKI M, NARUSAKA M, ABE H et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stress by using a full-length cDNA microarray [J]. *The Plant Cell*, 2001, 13: 61-72.
- SEKI M, NARUSAKA M, ISHIDA J et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity by using a full-length cDNA microarray [J]. *The Plant Cell*, 2002, 31 (3): 279-292.
- SNAPE J R, MAUND S J, PICKFORD D B, et al. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 67: 143-154.
- SNELL T W, BROGDON S E, Morgan M B. Gene expression profiling in ecotoxicology [J]. *Ecotoxicology*, 2003, 12: 475-483.
- SONENBERG N, HERSHEY J, MATHEWS M. Translational control of gene expression [M]. 北京: 清华大学出版社 & 冷泉港实验室出版社, 2002.
- SWINDELL W R. The association among gene expression response to nine abiotic stress treatments in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 2006, 174: 1181-1824.
- TULLY D B, BAO W, GOETZ A K, et al. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 215: 260-273.
- VELCULESCU V E, ZHANG L, VOGELSTEIN B, et al. Serial analysis of gene expression [J]. *Science*, 1995, 270: 484-487.
- VICTOR P, MERCEDES M P, ELENA G T. Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (2): 453-463.
- WANG H, MIYAZAKI S, KAWAI K, et al. Temporal progression of gene expression response to salt shock in maize roots [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52: 873-891.
- WANG J. From DNA biosensors to gene chips [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 3011-3016.
- WANG J, WANG S, MANZER R, et al. Ozone induce oxidative stress in rat alveolar type II and type I-like cells [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 40: 1914-1928.
- WANG J, XU Z, FANG H, et al. Gene expression profiling of MPP<sup>+</sup>-treated MN9D cells: a mechanism of toxicity study [J]. *Neuro Toxicology*, 2007, 28: 979-987.
- WILLIAMS D L, SAYED A A, BERNIER J, et al. Profiling *Schistosoma mansoni* development using serial analysis of gene expression (SAGE) [J]. *Experimental Parasitology*, 2007, 117: 246-258.
- WILLIAMS T D, GENSBERG K, MINCHIN S D, et al. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65: 141-157.
- WOYKE T, BERENS M E, HOELZINGER D B, et al. Differential gene expression in auristatin PHE-treated *Cryptococcus neoformans* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48 (2): 561-567.
- YONEDA K, PECK K, CHANG M M, et al. Development of high-density DNA microarray membrane for profiling smoke- and hydrogen peroxide-induced genes in a human bronchial epithelial cell line [J]. *American Journal of*



Respiratory and Critical Care Medicine, 2001, 164: 85-89.

ZINSER C, SEIDLITZ H K, WELZL G, et al. Transcriptional profiling of summer wheat, grown under different realistic UV-B irradiation regimes [J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164: 913-922.

ZOLDOS V, YAKOVLEV S S, PAPES D, et al. Representational difference analysis reveals genomic differences between *Quercus robur* and *Q. suber*: implications for the study of genome evolution in the genus *Quercus* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2001, 265: 231-241.

# 植物重金属转运蛋白及其基因的研究进展

刘声传 段昌群\*

(云南大学生命科学学院暨云南生物资源保护与利用国家  
重点实验室培育基地, 昆明 650091)

## Advance in Heavy Metal Transport Proteins and Their Related Genes in Plant

Liu Sheng-chuan Duan Chang-qun\*

(School of Life Science and Yunnan Key Laboratory of Bio-Resource Conservation and Utilization,  
Yunnan University, Kunming 650091, China)

**摘 要** 转运蛋白在重金属的吸收、转运、分布和累积过程中扮演着一个重要角色, 在重金属体内平衡中起重要作用, 植物重金属转运蛋白及其基因研究成为了污染生态学领域的一个热点。然而, 关于植物重金属转运的分子机制还不十分清楚。本文从根际活化、根系吸收、木质部运输、卸载和组织分配方面述评了当前关于植物吸收重金属机理的研究动态。对植物重金属转运蛋白及其基因, 如: ZIP (zinc regulated protein/iron regulated protein, ZRT/IRT 相关的蛋白质)、HMA (heavy metal ATPases)、CDF (cation diffuse facilitator)、YSL (yellow stripe-like)、ABC (ATP-binding cassette)、NRAMP (natural resistance associated macrophage proteins)、CAX (cation exchange)、COPT (copper transporter) 的结构功能特征、定位、表达、调控进行了归纳分析, 并对今后的研究进行了展望。

**关键词** 重金属; 转运蛋白; 植物修复; 植物抗性

**Abstract** Transporter proteins play an important role in the process of the absorption, transport, distribution and accumulation of heavy metals. They are key elements for metal homeostasis, so the study of plant heavy metal transport proteins and their genes becomes a hot topic in the research field of

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30760049, 30640022), 国家 973 项目 (2003CB14510305), 教育部“新世纪优秀人才支持计划资助” (NCET-04-0914) 及高等学校博士学科点专项科研基金 (20040673002) 资助。

\* 通讯作者: chquduan@ynu.edu.cn



pollution ecology. However, the molecular mechanisms of plant heavy metal transport are not quite clear. From the aspects of root mobilization, root absorption, xylem transport, unloading and tissue distribution, advance in the mechanism of heavy metal uptake in plant has been reviewed in the present paper. The structure and functional characteristics, location and expression regulation of heavy metal transport proteins and their genes in plants were presented, such as, ZIP (zinc regulated protein/iron regulated protein), HMA (heavy metal ATPases), CDF (cation diffuse facilitator), YSL (yellow stripe-like), ABC (ATP-binding cassette), NRAMP (natural resistance associated macrophage proteins), CAX (cation exchange), COPT (copper transporter), and the outlook of the future study was discussed.

**Key words** Heavy metals; transporter; phytoremediation; toxicol resistance

## 1. 前言

高等植物的矿质营养对农业和人类的健康非常重要,然而许多基本问题仍然不清楚,特别是种类多、作用复杂的重金属的吸收、转运机制。植物如何确保所有的组织得到适当的有益重金属的补给,同时又要避免达到有毒水平的累积;以及在重金属污染环境的生物修复中,我们需要找到理想的超积累植物;而在污染环境的农业生产中,我们则呼唤获得拒吸收有害重金属的清洁种质。这些长期以来都是生态学,尤其是污染生态学领域存在的重要问题。随着分子生物学技术的发展,人们在很多方面取得了新的认识,并在相关领域的研究越来越成熟 (Lorraine *et al.*, 2000)。

植物对有害元素的吸收和转运是植物营养学、植物污染生态学等多个学科关注的焦点问题之一。有些重金属是植物所必需的微量营养元素 (如 Zn、Ni、Cu、Fe 等),对于维持植物正常新陈代谢很重要,它们的作用可能是特定酶的辅酶或激活剂,或稳定有机分子。但是,如果这些必需重金属浓度过高,以及非必需重金属 (如 Cd、Pb、Cr、Hg、As 等) 被植物吸收,植物的很多生理活动会受到干扰 (张国平等, 2003; Frederic *et al.*, 2004)。这些金属阳离子在植物体内的分配与不同转运体家族有关,转运蛋白在重金属体内平衡中起重要作用 (Lorraine *et al.*, 2000)。根据转运蛋白的转运机制和它们的生理学功能,利用生物化学和分子生物学技术将会使我们加深对转运蛋白的理解,并可能以此遴选或培育出超积累植物种质和在受污染土壤生长的可食部位重金属含量未超标的农作物。现在,用于土壤和水污染的植物修复引起了人类广泛兴趣,重金属转运的研究备受关注 (Stephan *et al.*, 2002)。

本文就近年来国际上对植物特别是模式植物重金属转运蛋白及其基因研究进展作一述评,为相关研究提供资料和背景知识平台。

## 2. 植物吸收转运重金属的过程

植物对重金属的吸收很大程度上依赖于重金属在土壤中的生物有效性 (水溶态,可交换态),然而,具生物有效性的重金属仅占土壤重金属总量的很小一部分,植物为了满足自身对重金属的需要,必须有活化土壤中非有效态重金属的能力 (孙琴等, 2005)。植物根系可以通过活化根际土壤中的重金属而增加吸收能力:如根系分泌质子酸化根际环境、分泌特殊有机

物、分泌金属螯合分子（如植物高铁载体、植物螯合剂等）等促进土壤重金属溶解（孙琴等，2005）。

水溶金属离子经质体流途径、扩散途径到达根表面，然后通过交换吸附在根细胞表面。吸附在根表面或根毛皮层上的金属离子首先被细胞壁、质膜吸附，然后通过质外体或共质体途径进入根细胞内累积，但是由于内皮层上有凯氏带，离子不能通过，只有转入共质体后才能进入木质部导管。在金属跨过根细胞膜进入根细胞共质体或金属跨过木质部薄壁细胞的质膜装载进入木质部导管时由专一转运蛋白或通道蛋白调控。金属离子进入根细胞质后，可以以游离金属离子形态存在，但细胞质中游离金属离子过多，会对细胞产生毒害作用，干扰细胞的正常代谢，因而细胞质中金属可能与细胞质中的有机酸、氨基酸、多胺和无机物等结合，通过液泡膜上的转运体或通道蛋白转入液泡中。植物（尤其是超积累植物）的液泡膜上，可能存在一些特殊的转运体，能把暂时贮存在液泡中的金属装载到木质部导管中。

根细胞内的金属离子横穿根的中柱，被送入导管，装载入导管后随蒸腾拉力向地上部移动，分配到其他组织和器官中。目前对于金属离子在木质部的装载过程还不十分明确，金属离子在木质部的装载可能通过阳离子-质子反转运体来完成。在超积累植物中，可能存在更多的离子转运体或通道蛋白，从而促进重金属向木质部装载。重金属在超积累植物的木质部导管中的运输速率很高，在木质部存在大量的有机酸和氨基酸，它们能够与金属离子结合，这种复合物是重金属离子在木质部运输的主要形式：譬如在木质部，Fe 主要是以柠檬酸铁的形式存在，Zn 主要是与柠檬酸或苹果酸结合，当然也有许多是以离子形态存在的，如 Ca、Mg、Mn（李文学等，2003）。在超富集植物中研究较多的为组氨酸，在植物（*Alyssum montanum* L. 庭荠属的一种）中，组氨酸与  $\text{Ni}^{2+}$  结合使 Ni 装载入木质部的转运率增加 50%，另外一些超积累植物也有类似现象（Stephan *et al.*，2002）。

通过木质部导管运输，重金属到达叶的质外体，然后被叶细胞吸收。转运体调节金属离子进入共质体，经由质外体或共质体途径在叶内分配，金属离子交换发生在植物内部的每个细胞，以维持每个细胞器中特定的生理学的浓度范围和确保蛋白质之间必需金属的传输，一些转运蛋白参与了这个过程（Stephan *et al.*，2002）。过多的必需重金属，连同非必需重金属在叶液泡中被隔离。不同的叶细胞浓度不同，分配方式因植物和元素种类而改变（Stephan *et al.*，2002）。例如，在天蓝遏蓝菜（*Thlaspi caerulescens*）叶中，表皮细胞比叶肉细胞高 5.0 ~ 6.5 倍，此外，叶毛（trichomes）在金属的贮存和解毒中起重要作用（Kiipper *et al.*，1999）。据报道，在植物芥菜（*Brassica juncea*）中，皮毛 Cd 积聚占叶积累总量的 40% 多（Stephan *et al.*，2002）。

在植物对重金属的吸收过程中，包括如下关键环节：①根际活化；②金属离子进入根细胞和木质部；③木质部运输；④地上部分组织和器官的分布、贮存、交换和排出（见图 1）。除了根际活化外，其他过程都与一些转运蛋白相关，研究转运蛋白及其对应的基因在这几个过程的功能，以及它们的结构特点，对于植物修复和无公害农作物生产具有重要的科学意义。



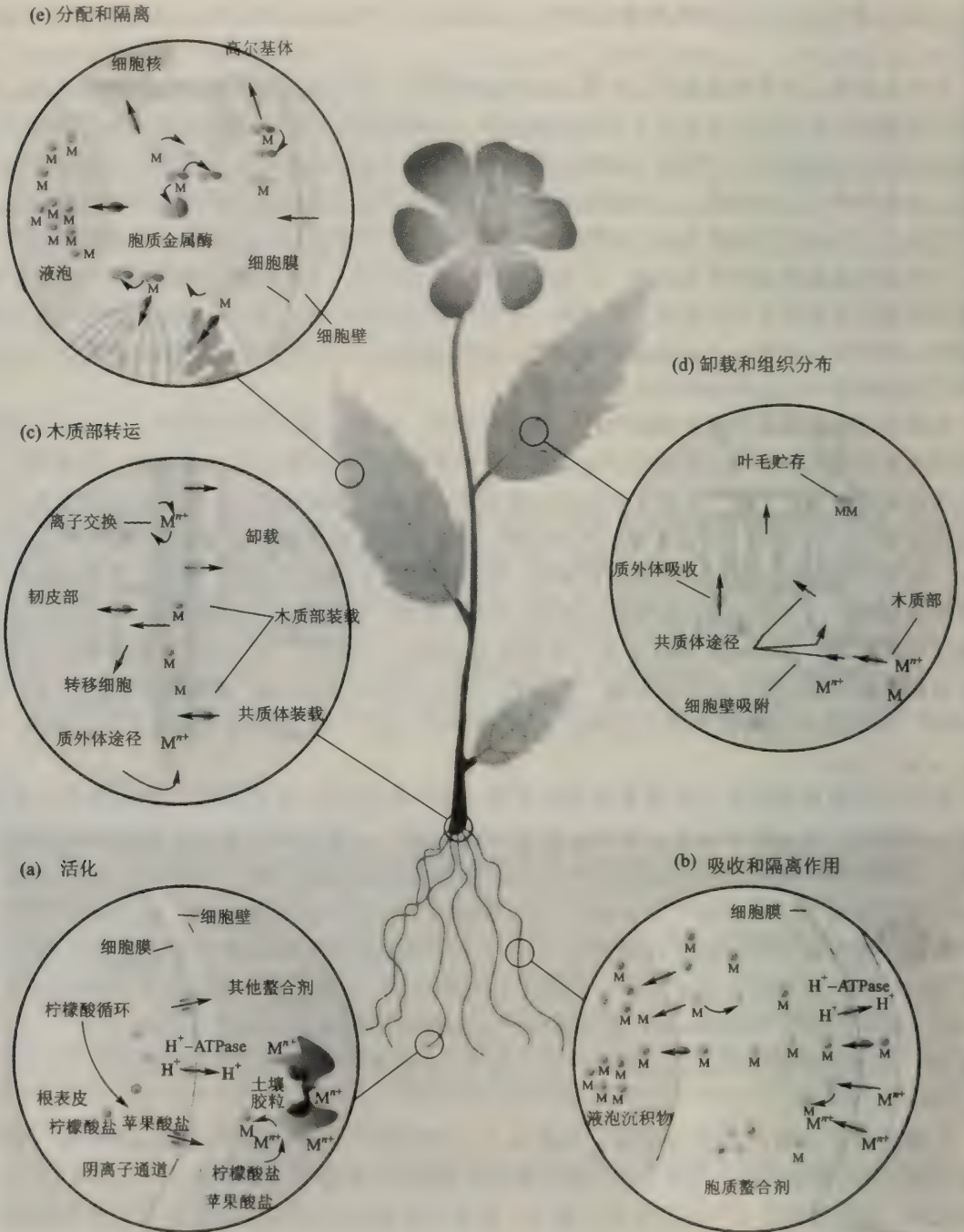


图1 植物重金属积累的分子机制 (引自 Stephan *et al.*, 2002)

Fig.1 Molecular mechanisms of metal accumulation by plants

(a) 金属离子被整合剂的分泌物和根际圈的酸化作用活化。(b) 水合金属离子或金属整合物的吸收被位于质膜的不同吸收系统调节。在细胞内, 金属被整合, 多余的金属被转运到液泡隔离。(c) 通过木质部重金属被从根转运到芽, 大部分经由根的共质体到达木质部, 非共质体通道可能在根顶端出现。在木质部内, 金属以水合离子或金属整合物的形式存在。(d) 到达叶的质外体之后, 金属有差异地被不同类型叶细胞吸收, 经过胞间连丝在细胞间移动, 贮存似乎优先在叶毛中出现。(e) 不同转运体再次促进金属进入叶细胞之内。细胞内金属的分配被金属伴侣蛋白 (metallochaperones) 和位于质膜的不同转运体调节。符号: M, metal (金属)

### 3. 植物重金属转运相关蛋白及其基因

如前文所述, 土壤中的重金属离子被植物根系细胞吸收, 或转运到特定细胞器 (如液泡), 或转运到输导组织向地上部运输, 再转运到特定器官、组织或细胞器, 每一个过程都需要一些特定的转运体来完成 (Mingorance *et al.*, 2007)。目前, 在植物中发现转运蛋白家族有 HMA、CDF、ZIP、YSL、ABC、NRAMP、CAX、COPT 等, 这些转运蛋白家族具有不同的结构特征, 它们通过不同的基质特性、表达式样和细胞定位变化来控制金属在植物体内的移动。另外, 因为植物基因表达不仅具有组织特异性和发育阶段的特异性, 而且也受到环境因素的影响, 单个细胞中表达的基因仅占总数的 15%, 不同的基因随时间、空间而有选择地表达, 这些家族基因的表达差异决定这些转运蛋白家族功能。因此, 这些转运蛋白家族的不同特性及其对应基因家族成员的有无、含量大小、基因表达变化等使植物对有害元素吸收积累具有不同特性。

#### 3.1 金属外排蛋白 (metal efflux proteins)

##### 3.1.1 HMA 家族

P-type ATPase 是一种通过水解 ATP 进行跨膜运输的转运蛋白, 根据其转运底物特异性可以分为 5 类: 即  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,  $\text{H}^{+}$ -ATPase,  $\text{P}_{1\text{A}}$ -type ATPase (转运  $\text{K}^{+}$ ),  $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPase, typeIV ATPases (似乎转运磷脂体 phospholipids), 其中  $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPase 是与多种重金属离子如  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  等跨膜运输有关的转运器, 它也被称作重金属 ATP 酶 (HMA, heavy metal ATPases; CPx-type ATPases) (Lorraine *et al.*, 2000; Axelsen and Palmgren, 2001; Williams and Mills, 2005)。 $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPase 有和其他 P-type ATPase 转运蛋白不同的结构特征, 在 ATP 与细胞质结合的环中,  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases 包含 6~8 个跨膜片段转运信号序列 (见图 2), 这些序列区分为至少四个具有金属选择性转运的  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases 小群: 对  $\text{Cu}^{+}$  的  $\text{P}_{1\text{B}}-1$ , 对  $\text{Zn}^{2+}$  的  $\text{P}_{1\text{B}}-2$ , 对  $\text{Cu}^{2+}$  的  $\text{P}_{1\text{B}}-3$ , 对  $\text{Co}^{2+}$  的  $\text{P}_{1\text{B}}-4$ 。在闪烁古生球菌 (*Archaeoglobus fulgidus*) 的  $\text{Cu}^{+}$ -ATPase 研究中, 在不变跨膜域, 发现半胱氨酸 Cys 的突变在 H6, 天冬酰胺 Asn 和酪氨酸 Tyr 突变在 H7, 以及甲硫氨酸 Met 和丝氨酸 Ser 突变在 H8, 而且显示它们的侧链可能在转运期间调控金属转运并且是构成这些转运蛋白的一个主要成分 (Jose and Arguello, 2007)。大多数 P-type ATPase 包括一个磷酸化域、一个细胞质结合主要域、一个核苷酸结合域、一个侧链域和一个  $\beta$  环, 但许多  $\text{P}_{1\text{B}}$ -typeATPase 还有一个排列不同的细胞质金属结合域 (cytoplasmic metal binding domains) (Jose and Arguello, 2007), 虽然它们的结构不同, 但所有的 N-MBD (N 末端金属结合域) 和 C-MBD (C 末端金属结合域) 可能控制酶的更新, 却对金属与跨膜转运位点无影响 (Jose and Arguello, 2007) (见图 2)。另外还包括一个起转运作用的 CPx 域 (cysteine-proline-histidine or cysteine-proline-serine motif, CPx motif) 和氨基或羧基末端金属结合域 (Elizabeth *et al.*, 2006)。

在拟南芥中有 8 个  $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPase 转运重金属 (HMA1~HMA8) (Baxter *et al.*, 2003), 其中 4 个家族成员 (HMA1~HMA4) 与  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  跨膜转运有关, HMA5~HMA8 是 Cu/Ag 单价阳离子的转运蛋白 (Williams and Mills, 2005; Cobbett *et al.*, 2003)。在酵母中 HMA2 和 HMA4 的金属转运研究提供了它们有酶的功能和运输能力的证据 (Eren and Arguello, 2004)。在野生型酵母和金属敏感型酵母中 HMA4 的不同表达证明 HMA4 转运 Zn, Cd 和 Pb (Verret *et al.*, 2005)。放射性同位素示踪的  $^{109}\text{Cd}$  和  $^{65}\text{Zn}$  吸收转运实验显示: 含有 HMA4 酵母菌株与无 HMA4 对照菌株相比, Cd、Zn 的累积增加, 这与 HMA4 在金属转运中的作用一致, 对于 HMA3 也有类似结果 (Gravot *et al.*, 2004)。在酵母中一个 HMA4 保守的 DKTGT 域 D



磷酸化作用位点的突变抑制了金属转运能力, 表明 HMA4 决定金属转运并非螯合作用 (Verret *et al.*, 2005)。拟南芥 AtHMA2 和 AtHMA4 从根转运重金属到芽 (Kramer, 2005) (见图 5)。HMA7 在转运 Cu 至高尔基体上的激素受体是很重要的 (Hirayama *et al.*, 1999; Woeste and Kieber, 2000)。最近, HMA5 被视为一个诱导根吸收 Cu 的基因 (Andres-Colas *et al.*, 2006)。

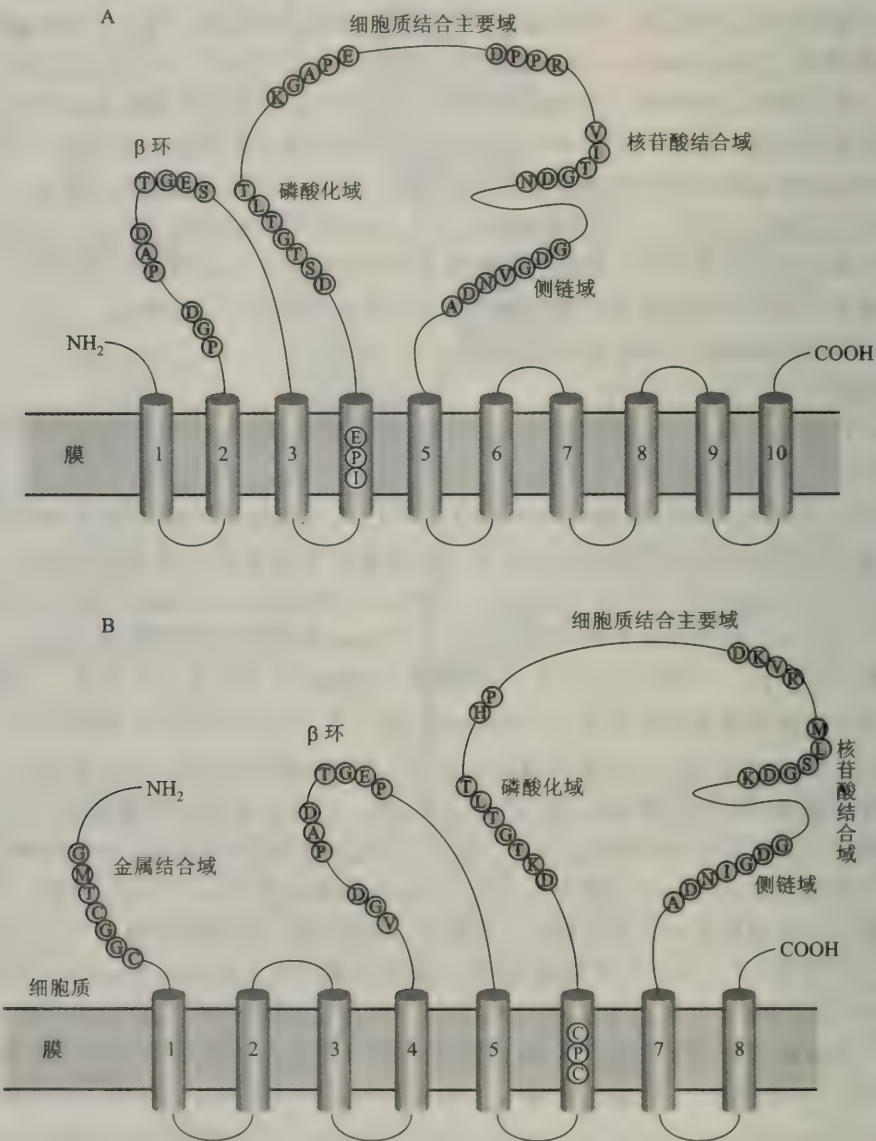


图 2 拟南芥的两种 P - typeATPase 结构比较 (引自 Lorraine *et al.*, 2000)

Fig.2 A structural model comparing two types of P - type ATPase from *Arabidopsis thaliana*

图 A 是  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase, 图 B 是 P<sub>1B</sub> - type ATPase (PAA1)

逆转录基因方法在植物中成功揭示了 HMA 家族成员的功能。虽然没有野生型的表型与土生 HMA2、HMA3 或 HMA4 个别突变体表型相似 (Hussain *et al.*, 2004), 但是当生长在高 Zn 或 Cd 浓度环境时 HMA4 植物显示对 Zn 和 Cd 敏感, HMA2、HMA4 双突变体植物萎黄、矮小、不结种子, 但可以通过高 Zn 溶液 (1 或 3 mmol/L) 的处理改变这种表型, 但不是 Co 或 Cu (Hussain *et al.*, 2004)。双突变体 (不是单突变体) 植物表型研究表明这些基因功能丰富, 并发现这些基因

在 Zn 动态平衡的缺点：当生长在 10 mmol/L Zn (Zn 充足) 之下, HMA2、HMA4 植物的 Zn 积累水平比野生型植物低 2 ~ 4 倍, 但当缺 Zn 情况下, 双突变体植物 Zn 含量是野生型植物的 2 倍 (Hussain *et al.*, 2004)。同样, 在 HMA4 功能损失的突变体植物叶中 Zn 和 Cd 含量减少 (Hussain *et al.*, 2004), 35SHMA4 植物 (HMA4 过量表达) 在叶中 Zn 和 Cd 累积水平提高 (Verret *et al.*, 2004)。HMA2、HMA4 植物表型, 连同补充的 HMA4 过量表达数据一起, 说明 HMA2 和 HMA4 在 Zn 从根到芽的转运过程中起作用。

三个  $P_{1B}$  - ATPases 参与了叶绿体的 Cu 转运。HMA1 和 HMA6 在质膜上转运 Cu 到细胞质 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2005; Abdel-Ghany *et al.*, 2005) (见图 3)。虽然 HMA1 家族有转运 Zn, Cd, Pb, Co 的转运体, 但在酵母中只发现 HMA1 有转运 Cu 和 Zn 的证据, 和野生植物相比, HMA1 植物增加对强光的敏感而且减少了叶绿体中 Cu 的含量 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2005)。HMA1 和 HMA6 没有其他多余的功能, 在叶绿体中 HMA1 或 HMA6 功能损失的突变体累积大约野生植物一半的 Cu (Seigneurin-Berny *et al.*, 2005; Abdel-Ghany *et al.*, 2005)。虽然双突变体还没有被分析, 但叶绿体 Cu 累积功能完全损失被认为可能在 HMA1、HMA6 植物存在。HMA8 (PAA2) 位于类囊体膜上, 具有转运 Cu 至类囊体内腔的功能 (Abdel-Ghany *et al.*, 2005), 通过 HMA8 植物叶绿体片断元素分析发现与整个叶绿体相比较类囊体中 Cu 含量大大减少, 这与 HMA8 的定位一致, 也说明这一蛋白负责转运 Cu 进入类囊体内腔 (Abdel-Ghany *et al.*, 2005) (见图 3)。

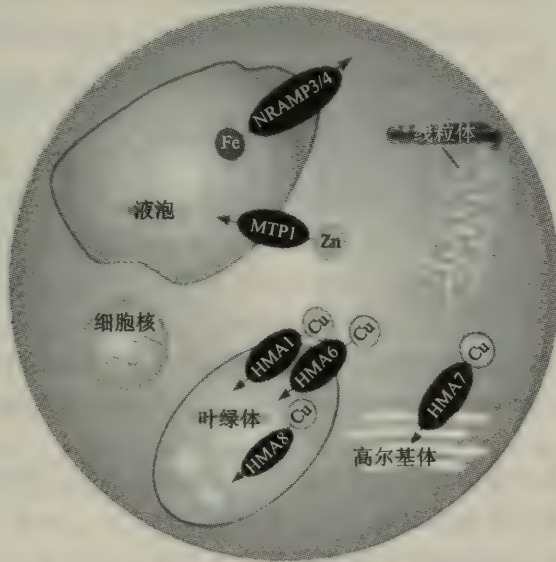


图 3 拟南芥细胞内金属转运 (引自 Elizabeth *et al.*, 2006)

Fig. 3 Intracellular metal transport in *Arabidopsis thaliana*

金属被转运到细胞内的细胞器和细胞内的细胞器金属再转运被认为在细胞内离子动态平衡中很重要。通过具体的转运方向箭头, 在一个普通的细胞内概述了位于细胞内的金属转运体和它们的转运底物。在幼苗发育期间, NRAMP 蛋白的 NRAMP3 和 NRAMP4 具有转出液泡 (vacuolar) 中储存的 Fe 的功能。CDF 家族成员 MTP1 存在于根和叶中, 它转运 Zn 进入液泡。与 Cu 体内平衡有关的四个  $P_{1B}$  - ATPases 已在细胞内被定位。HMA6 (PAA1) 和 HMA1 定位于质膜上 (plastid envelope), HMA8 (PAA2) 在类囊体 (thylakoid) 薄膜上, 而且 HMA7 (RAN1) 位于高尔基体 (Golgi body) 负责 Cu 的载入。

### 3.1.2 CDF 家族

金属转运体 CDF (cation diffuse facilitator) 家族普遍存在于真核生物界, 它包含 6 个跨膜域, 在跨膜域 4 和 5 之间有一个富含组氨酸的易变环, C 末端和 N 末端的氨基酸均位于细胞膜外, 编



码从细胞质转出重金属的反转运体 (Gaither and Eide, 2001) (见图 4A)。在拟南芥第一个被发现的 *CDF* 基因是锌转运蛋白 *ZAT1*, 后来把它重新命名为抗金属蛋白 (*MTP1*) (Delhaize *et al.*, 2003)。在植物中 *MTP1* 的过量表达能抵抗 Zn 胁迫, 插入和拆卸 *MTP1* 基因突变体的 Zn 敏感表型也说明 *MTP1* 在 Zn 体内动态平衡中起作用 (Kobae *et al.*, 2004; Desbrosses-Fonrcuge *et al.*, 2005)。拟南芥 *AtMTP1* 的短暂表达——拟南芥的原生质体绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) (Kobae *et al.*, 2004; Desbrosses-Fonrcuge *et al.*, 2005), 稳定线分析和生物化学研究指出 *AtMTP1* 位于叶和根细胞的液泡膜上, 在液泡 Zn 累积上起作用 (Kobae *et al.*, 2004; Desbrosses-Fonrcuge *et al.*, 2005) (见图 3)。含 *MTP1* 基因少的植物在各种不同组织中累积比较少的 Zn 的证据指出: 液泡贮藏 Zn 的缺陷影响 Zn 的吸收或分布 (Desbrosses-Fonrcuge *et al.*, 2005)。

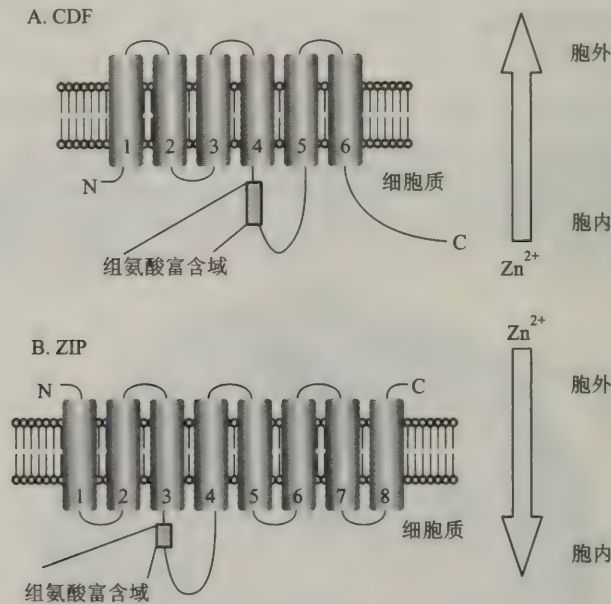


图 4 ZIP 和 CDF 金属离子转运体家族跨膜结构 (引自 David and Eide, 2006)

Fig. 4 The predicted membrane topologies of the ZIP and CDF families of metal ion transporters  
跨膜域用数字 1, 2...标注

了解超积累植物转运重金属的分子机制对于植物修复很有意义。多种金属转运体家族的调节是一些超积累植物能够增加转运金属到地上部分组织的一种方法, 这是超积累植物的一个特征。Zn/Cd 超积累植物拟南芥比其他非超积累植物能安全地累积 100 多倍的 Zn。通过微阵列分析发现 Zn 累积与芽中 *MTP1* 和根中氨基酸尼克酰胺 (NA) 合成酶基因表达的增加有关 (Becher *et al.*, 2004)。叶芽拟南芥 (*Arabidopsis halleri*) 包含三个独立隔离的和不同调控的 *MTP1* 基因, 在超积累植物阿拉伯芥和非超积累植物琴叶拟南芥 (*Arabidopsis lyrata*) 的回交杂种中, 两个与抗 Zn 有关的 *MTP1* 分离 (Drager *et al.*, 2004)。对于叶芽拟南芥转运体 *AhMTP1* ~ 3 转运 Zn 的功能证据, 由 Zn 敏感显性植物 *ZRC1* 和 *COT1* 功能互补提供, 即一种缺乏液泡 CDF 家族成员 *ZRC1* (zinc resistance conferring1 transporter1, *ZRC1*) 和钴转运体 *COT1* (cobalt transporter1, *COT1*) 的 Zn 超敏感菌株 (Drager *et al.*, 2004)。像 *AtMTP1*、*AhMTP1* ~ 3 也位于液泡薄膜上, 位于拟南芥原生质体的 *AhMTP1* ~ 3 也通过绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的短暂表达显示 (Drager *et al.*, 2004)。

另外,为了抑制金属胁迫,一种 Ni/Zn 超积累遏蓝菜属植物野生芥末 (*Thlaspi goesingense*) 也依赖于 CDF 转运体的过量表达 (Persans *et al.*, 2001)。当 TgMTP1b (抗金属蛋白) 在 ZRC1、COT1 植物中表达时, ZRC1、COT1 植物中 Zn 的含量减少到了原来的 50% (Kim *et al.*, 2004)。通过改变 ZRC1、COT1 植物的 *TgMTP1b* 复制编码,发现 *TgMTP1b* 的表达程度与 Zn 排出率成正比 (Kim *et al.*, 2004),这一结果表明 TgMTP1b 不具有对高 Zn 的抗性。然而,长期的和短期的吸收转运研究证明 TgMTP1b 在 Zn 的转运、排出中扮演了重要的角色。这个证据,连同 TgMTP1b 在质膜的定位及位于拟南芥原生质体的 GFP 表达,表明在超积累植物野生芥末 (*Thlaspi goesingense*) 中 MTP1 在质膜中对 Zn 的转运起一定的作用 (Kim *et al.*, 2004)。

最近还发现: FieF 作为 CDF 的一个最大亚族的成员,其转运铁的功能已被鉴别和描述 (Gregor, 2007)。

### 3.2 金属吸收蛋白 (metal uptake proteins)

#### 3.2.1 ZIP 家族

在参与金属离子吸收的转运体蛋白中,特别引人注意的是称之为“ZIP”的蛋白质 (zinc regulated protein/iron regulated protein, ZRT/IRT 相关的蛋白质) 及其相关基因,在不同种类的真核生物中已发现有 ZIP 基因存在。ZIP 蛋白通常是维持植物金属离子动态平衡的因素之一,它们一般具有 8 个跨膜域 (transmembrane domain, TMD),在跨膜域 3 和 4 之间有一个富含组氨酸的易变环, C 末端和 N 末端的氨基酸均位于细胞膜外 (见图 4B)。目前超过 100 种 ZIP 蛋白已经在细菌、真菌、动物和植物中被鉴别 (David and Eide, 2004; Gueriot, 2000)。

ZIP 家族至少有 86 个成员,根据其结构同源型 (structural homology), ZIP 基因家族可以分为四个亚家族:即亚家族 I (主要存在于真菌和植物中,如 ZIP6、ZNT1、ZNT2、IRT1 等),亚家族 II (主要存在于哺乳动物、线虫和昆虫中,如 ZIP1~3 等), *gufA* 亚家族 (与黏细菌 *Myxococcus xanthus* 的 *gufA* 基因相关而命名,但此家族功能尚未清楚),亚家族 LIV-1 或称为 LZT (与 oestrogen-regulated gene 雌激素调控基因相关而命名,如 ZIP4 和 ZIP5 等) (Kathryn *et al.*, 2003)。一些学者以超积累植物、模式植物 (如拟南芥) 和酵母为研究对象,对这些基因家族成员的功能进行了研究。Lopez-Millan 等从一种苜蓿属植物蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 分离出编码  $Zn^{2+}$  转运体的基因 (*ZIP1*),在酵母中的表达可以使原来因缺  $Zn^{2+}$  而生长受阻的酵母突变体恢复生长 (Lopez-Millan *et al.*, 2004)。 $Zn^{2+}$  缺乏可以诱导 *ZIP1* 和 *ZIP3* 基因在拟南芥根系中表达 (Grotz *et al.*, 1998)。另外 Wintz 等通过微阵列和 RT-PCR 对拟南芥的研究显示 *ZIP2* 和 *ZIP4* 基因表达受缺铜诱导和在铜过量下被抑制。Wintz 等通过克隆 cDNA 文库中的 *ZIP2* 和 *ZIP4* 基因,在酵母中表达证实了 *ZIP2* 和 *ZIP4* 有转运铜的功能 (Wintz *et al.*, 2003)。*ZIP5* 在植物中的研究未见相关报道,但在哺乳动物老鼠中的研究发现 *ZIP5* 具有排除体内过多  $Zn^{2+}$  的功能 (Zhixin *et al.*, 2006)。与拟南芥相比,  $Zn^{2+}$  超积累植物叶芽拟南芥 (*Arabidopsis halleri*) 在根和芽中 *ZIP6* 转录水平提高了 23%~24%,意味着  $Zn^{2+}$  转运体 *ZIP6* 是有毒金属累积的因素之一 (Becher *et al.*, 2004)。有研究者认为 ZNT1 蛋白不仅是高亲和力的  $Zn^{2+}$  转运体还是低亲和力的  $Cd^{2+}$  转运体,它在  $Cd^{2+}$  的运输中起着重要作用 (Pence *et al.*, 2000)。在  $Zn^{2+}/Cd^{2+}$  超积累植物遏蓝菜 (*Thlaspi caerulescens* L.) 根中,  $Zn^{2+}$  的吸收转运增加与高的内生 TcZNT1 的表达有关 (Pence *et al.*, 2000)。Takafumi 等通过实验发现酵母 TjZNT1 或 TjZNT2 表达显示增加了对  $Ni^{2+}$  的抗性 (Takafumi *et al.*, 2007)。至于 IRT1 的研究, Cohen 等证明缺铁诱导 *IRT1* 在豌豆根中的表达 (见图 5), IRT1 除了转运  $Fe^{2+}$  外,同时还促进  $Cd^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  的转运 (Cohen *et al.*, 1998)。另外 Connolly 认为 *IRT1* 编码的膜蛋白 IRT1 可转运  $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  (Connolly *et al.*,



2002)。

此外,编码 ZIP 家族成员的六个 cDNAs 最近在模式植物藜苜蓿中被鉴别,而且对这六个 cDNAs 的酵母突变体吸收金属的功能进行了测试 (Lopez-Millan *et al.*, 2004)。每个家族成员都促进  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、及  $\text{Fe}^{2+}$  吸收以维持突变体的生长,说明每个家族成员都具有转运金属的功能。ZIP 在维持植物体内金属动态平衡中扮演了一个角色,表达分析证明 mRNA 的稳定水平是对金属的回应。例如, *MtZIP1* 转录只在  $\text{Zn}^{2+}$  缺乏的根和叶中被发现, *MtZIP1* 的表达使 ZRT1、ZRT2 酵母能够在低 Zn 基质上生长 (Lopez-Millan *et al.*, 2004)。MtZIP1 与 AtZIP1 有 59.6% 的同源性,而且 MtZIP1 似乎是一个  $\text{Zn}^{2+}$  转运体。

### 3.2.2 ABC 转运器

ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白是目前已知种类最多、功能最广泛的蛋白家族,参与生物体内多种物质的转运 (金宏滨等, 2007)。1992 年国际上报道了第一个植物 ABC 转运蛋白,即从拟南芥中克隆的 AtPGP1 (又称为 AtMDR1)。此后,研究人员对 ABC 蛋白及其相关基因进行了多方面的研究。

ABC 转运蛋白一般都有核苷酸结合域 (nucleotide binding fold, NBF) 和跨膜域 (transmembrane domain, TMD)。每个 NBF 包含 3 个特征性基序 (motif): Walker A 盒 [GX4GK (ST)], Walker B 盒 [(RK) X3GX3L (hydrophobic)3], 以及这两个 Walker 盒之间的 C 基序 [(LIVMFY)S (SG)GX3(RKA)(LIVMYA)X(LIVMF)(AG)], 其中 C 基序是 ABC 转运蛋白的特征性序列。由于功能的差异,ABC 转运蛋白的结构域组织形式也多种多样。通常,全分子的 ABC 转运蛋白包含 2 个 NBF 和 2 个 TMD,4 个结构域结合在一起才能执行转运功能。在大多数已鉴定的真核 ABC 转运蛋白中,这 4 个结构域以正向的 TMD1-NBF1-TMD2-NBF2 或者反向的 NBF1-TMD1-NBF2-TMD2 组织方式连接在一条多肽分子上,形成“全分子”ABC 转运蛋白。利用其他膜蛋白研究中采用的疏水性分析方法对 ABC 转运蛋白的二级结构进行研究,结果提示该结构中可能存在一些跨膜的螺旋和亲水性的环。P-gp (P-glycoprotein, 属于人类 MDR 类 ABC 转运蛋白,是较早发现的 ABC 转运蛋白之一)的生物化学研究证实了这种可能性。据预测 P-gp 含有两个跨膜域 (TMD),每个 TMD 跨膜 6 次,其后为核苷酸结合域 (NBF),这个模型已经被许多实验所证实 (金宏滨等, 2007)。

然而与其他生物 ABC 转运蛋白的研究相比,植物 ABC 转运蛋白的研究相对滞后,主要对一些模式生物进行研究,近来随着模式生物基因组测序的完成,人们对植物基因组中 ABC 转运蛋白的情况有了进一步的了解,在重金属转运方面的研究也开始受到关注。AtATM3 是拟南芥中的 ABC 型转运器,基因表达分析显示,当用  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  处理时,根中 AtATM3 表达上调。研究发现 AtATM3 过量表达的植物对  $\text{Cd}^{2+}$  的抵抗力增强 (Kim *et al.*, 2006);在  $\text{Pb}^{2+}$  处理的拟南芥中,只有 AtPDRI2 在茎和根中增加,表示可能与 Pb 解毒有关 (Kolukisaoglu *et al.*, 2002);AtPDRI2 过量表达的拟南芥对 Pb 的抵抗力增强,Pb 含量也比较低,因此,认为 APDRI2 对提高拟南芥抗 Pb 能力起到了作用 (Le *et al.*, 2005)。在拟南芥中 *ScYCF1* (酵母镉基因)的过量表达增强了植物对 Pb 和 Cd 的耐性 (Song *et al.*, 2003),缺少 *ScYCF1* 将导致植物对 Cd、As、Hg 敏感 (Guel-dry *et al.*, 2003)。在拟南芥中发现的 14 个 MRP 蛋白 AtMRP1~14,只有 AtMRP3 被证实与 Cd 的解毒、转运有关 (Kolukisaoglu *et al.*, 2002);在 Cd 的影响下,AtMRP3 基因表达上调,这个现象显然与植物器官中 Cd 的积累有关 (Bovet *et al.*, 2003)。

### 3.2.3 YSL 家族

YSL (yellow stripe-like) 家族是植物特有家族,在 YSL 家族中最好研究的对象是来自玉米的

YSL, YSL 蛋白被认为调节植物对与植物铁载体 (phytosiderophores, PS) 或氨基酸尼克酰胺 (NA) 结合的金属的吸收、转运, ZmYSL 蛋白积聚在缺 Fe 植物的根和叶中, 具有转运 Fe - PS 的功能 (Roberts *et al.*, 2004; Schaayf *et al.*, 2004)。酵母转运研究指出 ZmYSL 除了转运 Fe 之外可能还转运其他金属, 包括 Zn、Ni 和 Cu 等 (Roberts *et al.*, 2004; Schaayf *et al.*, 2004)。在植物中的研究主要集中在水稻 (*Oryza sativa*) 和拟南芥。在拟南芥中 AtYSL1 和 AtYSL2 最近已被详细研究: AtYSL1 是一个芽的特性基因, 在高 Fe 条件下它的转录水平增加 (Le *et al.*, 2005)。YSL2 位于内皮层 (endodermis) 和中柱鞘 (pericycle), 被认为转运 Fe 穿过内皮层和中柱鞘进入木质部 (见图 5)。在 Fe 充分情况下 AtYSL2 转录产物增加 (Didonato *et al.*, 2004; Schaayf *et al.*, 2005), AtYSL2 转录水平也回应 Cu 和 Zn 含量 (Didonato *et al.*, 2004, Schaayf *et al.*, 2005)。但 YSL2 单突变体没有明显的显型: 当它生长在土壤上或在各种不同的金属条件下没有显示金属积累被改变 (Didonato *et al.*, 2004)。水稻基因组包含 19 个公认的 OsYSL 基因, 在水稻中 OsYSL2 已被证明转运  $\text{Fe}^{2+}$  - NA 和  $\text{Mn}^{2+}$  - NA, 但不转运  $\text{Fe}^{3+}$  - PS (Koike *et al.*, 2004)。在 Fe 不足的叶中 OsYSL2 的转录产物被诱导增加, 而且 OsYSL2 - GUS 报告植物的分析指出, OsYSL2 在韧皮部中金属 - NA 的转运中起作用 (Koike *et al.*, 2004), Fe、可能的 Zn、Mn 和 Cu 在植物体内的平衡明显依赖于 YSL。

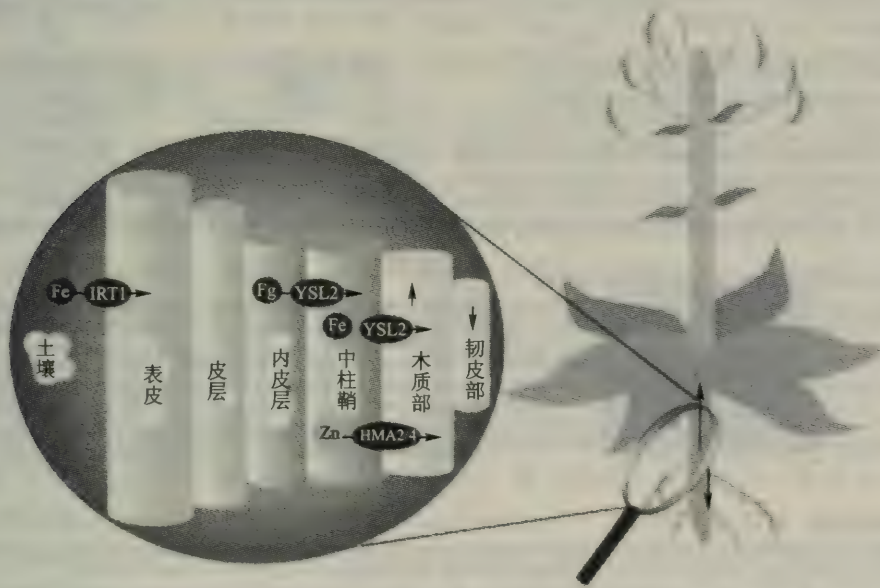


图 5 拟南芥根金属转运 (引自 Elizabeth *et al.*, 2006)

Fig. 5 Metal transport in *Arabidopsis thaliana* root

从土壤吸收 Fe 和 Zn, 穿过多层细胞薄膜, 转移到木质部, 转运到地面生长组织。图示质膜的转运体和它们的转运底物。在表皮 (epidermis) 的 IRT1 负责转运  $\text{Fe}^{2+}$  进入根内。YSL2 位于内皮层 (endodermis) 和中柱鞘 (pericycle), 被认为转运 Fe 穿过内皮层和中柱鞘进入木质部 (xylem)。两个  $\text{P}_{\text{IB}}$  - ATPases, HMA2 和 HMA4 功能丰富, 从根木质部转运 Zn 到地面生长组织

### 3.2.4 NRAMP 家族

NRAMP (natural resistance associated macrophage proteins, 自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 NRAMP) 是一种普遍存在的转运蛋白, NRAMP 基因最初是在哺乳动物和酵母菌中发现的, 随后植物中也发现了其同源序列并得到克隆。水稻中的 3 个 NRAMP 基因 OsNRAMP1、OsNRAMP2 和 OsNRAMP3 以及拟南芥中的 5 个 NRAMP 基因 AtNRAMP1、AtNRAMP2、AtNRAMP3、AtNRAMP4 和 AtNRAMP5 被相继克隆 (见图 6)。其中 AtNRAMP1 能修复铁转运蛋白基因 *fet3/fet4* 缺陷型的



AtNRAMP5	.....	0
OsNRAMP3	.....IPGPGFLISAIYIDPGNFE	19
OsNRAMP1	.....MGVTKEAAVAATGKVVDDIEALADLRKEPAWKFLSHIGPGFMVCLAYLDPGME	55
AtNRAMP1	.....MPQLENNEPPLLINE.....EEEEETAYDETEKVIHVRNEEDLEHGVCGGAPPPSWKGLWLTGPGFLMSIAFLDPGNLE	77
AtNRAMP3	.....MSETDRERPLASE.....ER.....AYEETEKVLIVGIDEEEDADYDDDPGNSPKFSWKGLWLTGPGFLMSIAFLDPGNLE	73
AtNRAMP2	MENDVKENLEEEEDRLPPPPSQS.LPST..DSESEAAFTNEKLLIVDFESPDDPTTGTPT...PPFSWRKLWLTGPGFLMSIAFLDPGNLE	89
OsNRAMP2	.....MRPAFSWRKLWLTGPGFLMSIAFLDPGNLE	31
AtNRAMP4	MTGSTVSRQENSPKRPNDNGEFKRLVPETSQPEDEHESPPENQILNVEEDRDKTYD...SVPPFSWAKLWLTGPGFLMSIAFLDPGNIE	91
MmNRAMP1	.....MISDKSPRLSRPSYSGISSIPGPAPQAPACRETYLSEKIPISADQGT..FSLRKLWLTGPGFLMSIAFLDPGNIE	76
*****		
M1		
AtNRAMP5	.....	0
OsNRAMP3	TDLQAGAQYKVELLWILIASCAALIQLSALRGLVVTGKPPGSIAEVEYPKATNFIWLIAELAVVACDIPEVIGTAFALNMLEK..SLCGVV	112
OsNRAMP1	TDLQAGANHKYELLWVILIGLIFALIQLSALRGLVVTGRHLA.ELCKTEYFVWVKTCWLWLAELAVIASDIPEVIGTGAENLLFH..IPVWTG	147
AtNRAMP1	GDQLAGAVAGYSLWLLMWATAMGLLVQLLSARLG VATGRHLA.ELCRDEYPTWARMVLWMAELALIGSDIQEVIGSAIAIKILSNGLPLWAG	171
AtNRAMP3	SDLQAGAIAGYSLWLLMWATAGLLIQLLSARLG VATGRHLA.ELCREEYPTWARMVLWMAELALIGADIQEVIGSAIAIKILSNGLPLWAG	167
AtNRAMP2	GDQLAGAIAGYSLWLLMWATAMGLLIQLLSARLG VATGRHLA.ELCRDEYPTWARYVLWMAELALIGADIQEVIGSAIAIKILSRGFLPLWAG	183
OsNRAMP2	GDQLAGAAAGYQLLWLLWATVMGALVQLLSARLG VATGKHLA.ELCREEYPPWATAALWAMTELALVGADIQEVIGSAIAIKILSAGTVPLWGG	125
AtNRAMP4	GDQLAGAVAGYSLWLLWATIMGLMLQLLSARIG VATGRHLA.EICRSEYPSWARIILWMAEVALIGADIQEVIGSAIAIKILTRGFLPIWVG	185
MmNRAMP1	SDLQAGAVAGFKLLWLLWATVTLGLLQRLAARLG VVTGKDLG.EVCHLYYPKVPRILLWLTIELAVGSDMCEVIGTAFENLLSAGRIPLWGG	170
*****		
M2		
AtNRAMP5	.....	0
OsNRAMP3	ILITGLSTIMLLLLQYGVRLLEFLIAILVSLIATCFVLGYSKPNSSVVRGLFVPELKGNGATGL..AISLLGAMVMPNHLHSELVLSRK	205
OsNRAMP1	VLIAGSSTLLLLGLQRYGVRLLEVVALLVFMAGCFFVEMSIKVPVNEVLQGLFIPRLSGPGATGD..SIALLGALVMPNHLHSELVLSRN	240
AtNRAMP1	VVITALDCVFLFLENYGIKRLKLEAVFAVLIATMGVSFAWMFGQAKPGSGELLIGILVPK...LSSRTIKQAVGVGCIIMPHNVFLHSALVQSR	263
AtNRAMP3	VVITALDWIFLFLFLENYGIKRLKLEAVFAVLIATMALAFAMFGQTKPSGTELLVGLVLPK...LSSRTIKQAVGVGCIIMPHNVFLHSALVQSR	259
AtNRAMP2	VVITASDCFLFLFLENYGVRLKLEAVFAVLIATMGLSFAMFGEKTPSGKELMIGILLPR...LSSKTIQAVGVGVCIMPHNVFLHSALVQSR	275
OsNRAMP2	VVITAFDCFLFLFLENYGVRLKLEAFFGVLIAMVAFMIFGTEKPSGKOLLIGLVVPK...LSSRTIKQAVGVGCIIMPHNVFLHSALVESRK	217
AtNRAMP4	VVITSFDCFLISYLEKCGMRKLEGLFAVLIATMALSFAWMFNETKPSVELFIGIIPK...LGSKTIQAVGVGVCITPHNVFLHSALVQSR	277
MmNRAMP1	VLITIVDTFFFLFLENYGLRLKLEAFFGLLITIMALTFGYEVVAHPSQAGALLKGLVLTPTCGCQPELLQAVGVGAIIMPHNYLHSALVQSR	265
*****		
M4		
AtNRAMP5	..PRASAGIKEACRFYLIESG.LALMVAFLINVSIVS.....SGAVCNAPNLSP.....EDRANCEDLDLNKASFLLRNVGKWSK	75
OsNRAMP3	EKRSVHGKEACRFYMIESAFIALTIATLINISIIISV.....NNNVCGSDNLSP.....EDQNCSDLDLNKASFLLRNVGKWSK	282
OsNRAMP1	TPASAKGMKDACRFFLFESG.IALFVALLVNIAIISV.....SGTVCNATNLSP.....EDAVKCSDLTLDSSSFLLRNVGKSSAT	316
AtNRAMP1	VDRKQYRVQALNYTTIES.TIALFISFLINLVTTVFAKGFY..NTDLANSI...GLVNAGQYLQ.....EKYGGGVF.....PILY	336
AtNRAMP3	VDPKRRFRVQALNYTTIES.TGALAVSFIINLVTTVFAKSFY..GTEIADTI...GLVNAGQYLQ.....DKYGGGVF.....PILY	332
AtNRAMP2	IDPKRRSRVQALNYTTIES.SVALFISMINLVTTVFAKGFY..GTEKANNI...GLVNAGQYLQ.....EKYGGGVF.....PILY	348
OsNRAMP2	IDTNKRSRVQAEVFFYNIES.IIALVVSFFINICVTTVFAKGFY..GSEQADGI...GLVNAGQYLQ.....QKYGTAFV.....PILY	290
AtNRAMP4	TDPKENRVQALNYTTIES.SAALFVSFMINLVTTVFAKGFY..GTQADSI...GLVNAGQYLQ.....EKYGGGVF.....PILY	350
MmNRAMP1	VDRTRVRDVREANMYFLIEA.TIALSVSFIINLVMAVFGQAFYQQTNEAFNICANSSLLQNYAKIPFRDNNVSVSDIYQGGVILGCLFGPAALY	359
*****		
M5		
AtNRAMP5	LFAIALLASGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLRLLEPW.....	111
OsNRAMP3	LFAVALLASGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLRLMTPWIRNLLTRSLAILPSLIVSIIGSSAAGQLII..IASMILTFEFSFASSTPKIKHQQDK	375
OsNRAMP1	YVGALLASGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLIRMKQWLRLNLMTRSIATVPSLIVSIIGSSAGRLIV..IASMILSFELPPALIPLLKFSSSSNK	409
AtNRAMP1	IWAIGLLAAGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLNFKMKWLRLALITRSCAIPTIIVALVFDSSSEATLDVNEWNLVLSIQIPFALIPLLCLVSKQEI	431
AtNRAMP3	IWAIGVLAAGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLNFKMKWVRLALITRSCAIPTIIVALVFDSSSMDLDELNENLVLSQVQIPFAVILPCLLVSNQEI	427
AtNRAMP2	IWIGLLAAGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLNRLKWKMRVITRSCAIVPTMIVAVLNTSVASLDVNEWNLVLSQVQIPFALLPLLTLSKEEI	443
OsNRAMP2	IWAIGLLAAGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLNRLKWLRAVITRSCAIVPTMIVAVLFFDTPMDIINEALNVLSIQIPFALIPLLTCLVSKQV	385
AtNRAMP4	IWIGILLAAGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLNQLMEQWLSAFITRSCAIVPTMIVAVLNTSEGSLDVNEWNLVLSQVQIPFAVILPCLLVSNQEI	445
MmNRAMP1	IWAVGLLAAGQSSTITGTAGYQYVMGFFDLNRLKWSRFAVLLTRSCAIVPTMIVAVLNTSEGSLLDNLVLSQVQIPFALLPLLTFTSPMPAV	452
*****		
M7		
AtNRAMP5	.....	111
OsNRAMP3	.....	385
OsNRAMP1	.....	504
AtNRAMP1	.....	509
AtNRAMP3	.....	512
AtNRAMP2	.....	530
OsNRAMP2	.....	464
AtNRAMP4	.....	530
MmNRAMP1	.....	545
*****		
M9		
AtNRAMP5	.....	111
OsNRAMP3	.....	385
OsNRAMP1	.....	504
AtNRAMP1	.....	509
AtNRAMP3	.....	512
AtNRAMP2	.....	530
OsNRAMP2	.....	464
AtNRAMP4	.....	530
MmNRAMP1	.....	545
*****		
M10		
AtNRAMP5	.....	111
OsNRAMP3	.....	385
OsNRAMP1	.....	504
AtNRAMP1	.....	509
AtNRAMP3	.....	512
AtNRAMP2	.....	530
OsNRAMP2	.....	464
AtNRAMP4	.....	530
MmNRAMP1	.....	545
*****		
M11		
AtNRAMP5	.....	111
OsNRAMP3	.....	385
OsNRAMP1	.....	517
AtNRAMP1	.....	509
AtNRAMP3	.....	512
AtNRAMP2	.....	530
OsNRAMP2	.....	464
AtNRAMP4	.....	530
MmNRAMP1	.....	548

图6 植物和哺乳动物 NRAMP 蛋白序列的比较分析 (引自 Lorraine *et al.*, 2000)

Fig. 6 Multiple alignment of plant and mammalian NRAMP protein sequences

序列下的星号表示同一氨基酸, 下划线部分表示跨膜域 (M1 ~ M12), 保守的转运序列用黑色标注

缺 Fe 症状,并且在 Fe 缺乏的时候能够超量表达,可能与 Fe 的吸收和体内平衡有关 (Curie *et al.*, 2000)。植物中毒研究发现 AtNRAMP1 有助于酵母突变体对 Fe 的吸收,在超表达的 AtNRAMP1 植物中观察到 AtNRAMP1 增加了植物对有毒 Fe 的抗性 (Curie *et al.*, 2000)。AtNRAMP3 和 AtNRAMP4 具有转出液泡 (vacuolar) 中储存的 Fe 的功能 (Elizabeth *et al.*, 2006) (见图 3)。AtNRAMP3 还可能与  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收有关。AtNRAMP1、AtNRAMP2 和 AtNRAMP3 在酵母菌中的单独表达证明它们与  $\text{Mn}^{2+}$  的吸收有关。这些转运体在金属离子浓度增加时表达会受到抑制 (Thomine *et al.*, 2000)。最近一个 AtNRAMP4 同族体——TjNRAMP4,已从 Ni 超积累植物 (*Thlaspi japonicum*, 遏蓝菜属的一个种) 中被克隆, TjNRAMP4 可能成为抗 Ni 的因素 (Mizuno *et al.*, 2005)。TjNRAMP4 的表达增加了野生型酵母对  $\text{Ni}^{2+}$  敏感性而且导致 Ni 积累的微量提高,表明 TjNRAMP4 蛋白可能转运 Ni 进入细胞质 (Mizuno *et al.*, 2005)。因为 TjNRAMP4 似乎不转运 Zn、Cd 或 Mn, TjNRAMP4 可能在 Ni 转运过程中有一特定的功能 (Mizuno *et al.*, 2005)。

### 3.2.5 CAX (cation exchange) 转运器

拟南芥中的 CAX1 为一液泡  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  转运体,和 CAX3 一样,可增加茎中  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  的浓度,降低茎中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度 (Eide *et al.*, 1996)。CAX2 具有转运  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  的功能,在烟草中表达 CAX2,可增加耐  $\text{Mn}^{2+}$  性 (Pence *et al.*, 2000)。AtCAX2 或 AtCAX4 基因编码二价阳离子/质子转运体,在烟草中可提高  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  选择性转运进入根液泡膜,还能提高植物根 Cd 积累 (Victor *et al.*, 2007)。生长在相同 Cd, Zn 和 Mn 毒害水平的 AtCAX2 和 AtCAX4 表达效果研究显示:在 35SAtCAX2 和 FS3AtCAX4 植物中,三种金属较少抑制生长 (更高抗性) (Victor *et al.*, 2007)。这与 Cd 抗性观察结果一致,FS3AtCAX4 植物当生长在 Cd ( $3\mu\text{mol/L}$ ) 土壤时 FS3AtCAX4 的表达同样减少,而且液泡质子泄漏提高,这些植物的根液泡膜质子转运体活动也保持提高 (Victor *et al.*, 2007)。CAX 转运体,不像液泡膜质子泵,不会被高 Cd 影响,而且那些含有 AtCAX 的液泡膜弥补了液泡膜质子泵和质子泄漏,因此造成液泡 Cd 充分积累从而提高抗性。在烟草中这些结果与液泡 CAX2 和 CAX4 转运体在抗高毒水平的 Cd、Zn 和 Mn 的作用一致 (Victor *et al.*, 2007)。

### 3.2.6 COPT (copper transporter) 家族

与 Cu 转运密切相关的 COPT (copper transporter) 蛋白家族在真核生物中普遍存在,拟南芥中 COPT 家族包括五个成员 COPT1 ~ COPT5 (Sancenon *et al.*, 2003)。这些蛋白质功能互补和具有转运铜的功能在酵母高亲和铜转运突变体中已被确定。用 RT-PCR 分析了拟南芥不同组织的 COPT1 ~ COPT5 mRNA 的具体表达模式,发现虽然所有的成员都被表达,但在根、茎、叶和花中,它们的表达量不同,而且稳定的 COPT1 和 COPT2 的 mRNA,以及在补助酵母高亲和铜转运突变体中最有效的成员,在铜过量时低水平表达,这与这些蛋白质在拟南芥细胞中参与铜转运的作用一致 (Vicente *et al.*, 2003)。

至今,仅 COPT1 被详细地描述了。COPT1 抗敏感植物显示 Cu 的转运减少,而且在叶中 Cu 的积累也减少 (Sancenon *et al.*, 2004)。COPT1 抗敏感植物显示花粉发育不全和根长增加,但这些表型可通过补充 Cu 逆转 (Sancenon *et al.*, 2004)。这些观测报告与在花粉和根尖中 COPT1 表达的报告一致,而且指出 COPT1 在植物生长发育中起作用 (Sancenon *et al.*, 2004)。



表 1 所讨论基因的概括  
Table 1 Summary of genes discussed in the context

所讨论基因	组织表达	细胞定位	诱导条件	已知转运底物	参考资料
编码金属外排蛋白					
P <sub>1B</sub> -ATPase (8)					
AtHMA2/4	根维管系统, 芽, 花粉囊	质膜		Zn, Cd	( Verret <i>et al.</i> , 2005 )
AtHMA5	根, 花		+ Cu	Cu	( Andres-Colas <i>et al.</i> , 2006 )
AtHMA6 ( PAA1 )	根, 芽	质膜		Cu	( Abdel-Ghany <i>et al.</i> , 2005 )
AtHMA8 ( PAA2 )	芽	类囊体膜		Cu	( Abdel-Ghany <i>et al.</i> , 2005 )
AtHMA1	根, 芽	叶绿体膜		Cu	( Seigneurin-Berny <i>et al.</i> , 2005 )
CDF (12)					
AtMTP1	根, 芽, 花	液泡膜		Zn	( Kobae <i>et al.</i> , 2004 )
AhMTP1	根	液泡膜	+ Zn	Zn	( Drager <i>et al.</i> , 2004 )
TgMTP1		质膜		Zn	( Kim <i>et al.</i> , 2004 )
编码金属吸收蛋白					
ZIP (16)					
OsZIP4	根, 芽 ( 韧 皮部分裂组织 )	质膜	- Zn	Zn	( Lopez-Millan <i>et al.</i> , 2004 )
MtZIP1	根, 叶		- Zn	Zn	( Lopez-Millan <i>et al.</i> , 2004 )
MtZIP3	根, 叶		- Mn, - Fe 抑制	Fe	( Lopez-Millan <i>et al.</i> , 2004 )
TcZNT1			- Zn	Zn	( Pence <i>et al.</i> , 2000 )
AtZIP1/3	根		- Zn	Zn	( Grotz <i>et al.</i> , 1998 )
AhZIP6	根, 芽			Zn	( Becher <i>et al.</i> , 2004 )
TjZNT1/2			Ni, + Zn	Ni, Zn	( Takafumi <i>et al.</i> , 2007 )
AtIRT1			+ Mn	Mn	( Vicente <i>et al.</i> , 2003 )
ABC (14)					
AtATM3	根		+ Cd, + Pb	Cd, Pb	( Kim <i>et al.</i> , 2006 )
AtPDR12	根, 茎		+ Pb	Pb	( Le <i>et al.</i> , 2005 )
ScYCF1			+ Cd, + Pb, Hg	Cd, Pb, Hg	( Gueldry <i>et al.</i> , 2003 )

续表

所讨论基因	组织表达	细胞定位	诱导条件	已知转运底物	参考资料
AtMRP3			+ Cd	Cd	( Kolukisaoglu <i>et al.</i> , 2002)
YSL (8)					
ZmYSL1	根, 芽		- Fe	Fe-PS, Cu-NA	( Roberts <i>et al.</i> , 2004)
AtYSL1	果, 叶, 花		+ Fe	Fe-NA	( Le <i>et al.</i> , 2005)
AtYSL2	根, 芽	质膜	+ Fe, - Zn 抑制		( Schaayf <i>et al.</i> , 2005)
OsYSL2	叶 ( 韧 皮 部), 根, 种子		- Fe	Fe -, Mn-NA	( Koike <i>et al.</i> , 2004)
NRAMP (6)					
AtNRAMP3/4	根, 芽, 种 子	液泡膜		Fe	( Mizuno <i>et al.</i> , 2005)
TjNRAMP4				Ni	( Mizuno <i>et al.</i> , 2005)
CAX (4)					
AtCAX1/3	茎	液泡膜		Mn, Zn	( Eide <i>et al.</i> , 1996)
AtCAX2				Ca, Cd, Mn	( Pence <i>et al.</i> , 2000)
COPT (5)					
AtCOPT1	根, 花粉, 气 孔, 毛状体		+ Cu 抑制	Cu	( Sancenon <i>et al.</i> ,2003, 2004)

\* 通过基因家族列表, 概述了全部已知基因的组织表达, 细胞定位, 以及增加稳定转录水平的已知条件和已知转运底物。拟南芥家族成员的数量在括号中被显示, 如无特别说明其底物都是二价。- : 缺少或减少; + : 过量或增加

4. 问题与展望

在过去的十多年间, 在重金属转运和分配中起作用的一些重金属转运体家族已被鉴别。主要序列分析已经预测了潜在的重金属结合蛋白质, 在一些转运体中已揭示金属调控表达模式。通过单突变体和更高序列突变体的检测和最近转运体在组织和细胞水平定位的研究提供了重金属转运体更多的功能证据。应用生物技术发现了来自多个重金属转运体家族的功能。但对这些基因编码的转运蛋白功能、作用和调节机理, 多数仍缺乏足够的了解。最近识别的金属转运体 YSL 家族成员被认为具有传送金属 - NA 合成物的功能, 然而具体转运底物的鉴定还需努力。虽然其他转运体家族成员的具体转运功能已经被确定, 但是, 在许多情况下, 哪些残留物调节了金属结合和哪些转运蛋白区域参与金属转运还不清楚。因此对许多植物转运体作用的了解还有待于对它们在亚细胞的定位和无功能突变体的进一步研究, 鉴于参与金属转运的大量家族成员, 更高次序突变体的分析在植物中确定功能是有可能的。

此外, 植物体内重金属的动态平衡与一系列转运体相关, 它的复杂性已引起了研究人员的重



视,虽然部分重金属转运体家族已被鉴别,但是各个家族个体的功能作用还没有完全区分。而且,这些转运体的定位、结构、功能、调控、分布、转运机制等还需进一步的研究。尤其是如何来调控这些转运体,仍然是一个挑战。因此,我们还需要深入理解植物体内重金属如何实现动态平衡,认识不同物种重金属转运体转运机制的差异性。

当前植物修复和无公害农作物的生产越来越受到人类的重视。然而,超积累植物具有地带性分布,生物量小,根较浅,生长缓慢,吸收重金属单一等缺点限制了它们用于大规模土壤污染修复的潜力,而一些非超积累植物具有这些优点。此外,面对日趋污染的环境,农业生产需要筛选出一些拒吸收、少吸收有害元素或可食部位有害元素含量低的种质。如果人类能够决定和操纵植物对重金属的吸收、拒绝吸收、隔离、重新分配等机制,经由分子遗传学及基因工程等生物学知识和技术选出人类所需的理想植物——超量积累植物用于植物的提取修复,拒吸收、少吸收植物用于清洁生产,那将对于人类的营养、健康和植物修复都有着深刻的意义。

## 参考文献

- 李文学,陈同斌.超富集植物吸收富集重金属的生理和分子生物学机制[J].应用生态学报,2003,14(4): 627-631.
- 金宏滨,刘东辉,左开井,等.植物ABC转运蛋白与次生代谢产物的跨膜转运[J].中国农业科技导报,2007, 9(3): 32-37.
- 孙琴,王晓蓉,丁士明.超积累植物吸收重金属的根际效应研究进展[J].生态学杂志,2005,24(1): 30-36.
- 张国平,植物生理生态学[M].周伟军译.浙江大学出版社,2003,193.
- ABDEL-GHANY S E, MULLFER-MOULE P, NIYOGI K K, et al. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts [J]. Plant Cell, 2005, 17: 1233-1251.
- ANDRES-COLAS N, SANCENON V, RODRIGUEZ-NAVARRE S, et al. The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots [J]. The Plant Journal, 2006, 45: 225-236.
- AXELSEN K B, PALMGREN M G. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 126: 696-706.
- BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN M R, et al. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice [J]. Plant Physiology, 2003, 132: 618-628.
- BECHER M, TALKE I N, KRALL L, et al. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. The Plant Journal, 2004, 37: 251-268.
- BOVET L, EGGMANN T, MEYLAN-BETTEX M, et al. Transcript level of AtMRPs after cadmium treatment induction of AtMRP3 [J]. Plant Cell Environ, 2003, 26: 371-381.
- COBBETT CS, HUSSAIN D, HAYDON M J. Structural and functional relationships between type heavy metal-transporting P-type ATPases in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2003, 159: 315-321.
- COHEN C K, FOX T C, GARVIN D F, et al. The role of iron deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants [J]. Plant Physiology, 1998, 116: 1063-1072.
- CONNOLLY E L, FETT J P, GUERINOT M L. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metal at the levels of transcript and protein accumulation [J]. Plant Cell, 2002, 14(6): 1347-1357.
- CURIE C, ALONSO J M, LE JEAN M, et al. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport [J].

The Journal of Biochemistry, 2000, 347: 749-755.

DAVID J. EIDE. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1763: 711-722.

DAVID J. EIDE. The SLC39 family of metal ion transporters [J]. The Journal of physiology, 2004, 447: 796-800.

DELHAIZE E, KATAOKA T, Hebb D M, et al. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance [J]. Plant Cell, 2003, 15: 1131-1142.

DESBROSSES-FONRCUGE A G, VCIGT K, SCHRODER A, et al. *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 4165-4174.

DIDONATO R J, ROBERTS L A, SANDERSON T, et al. *Arabidopsis* YELLOW STRIPE-LIKE2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes [J]. The Plant Journal, 2004, 39: 403-414.

DRAGER D B, DESBROSSES-FONRCUGE A G, KRACH C, et al. Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels [J]. The Plant Journal, 2004, 39: 425-439.

EIDE D, BRODERIUS M, FETT J, et al. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 5624-5628.

ELIZABETH P. COLANGELO and MARY LOU GUERINOT. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants [J]. Plant Biology, 2006, 9: 322-330.

EREN E, ARGOELLO J M. *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal porting  $P_{1B}$ -type ATPase, is involved in cytoplasmic homeostasis [J]. Plant Physiology, 2004, 136: 3712-3723.

FREDERIC VERRRE, ANTOINE GRAVOT, et al. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance [J]. FEBS Letters, 2004, 576: 306-312.

GAITHER L A, EIDE D J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation [J]. Biometals, 2001, 14: 251-270.

GRAVOT A, LIEUTAUD A, VERRET F, et al. AtHMA3, a plant  $P_{1B}$ -ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast [J]. FEBS Letters, 2004, 561: 22-28.

GREGOR GRASS. New transport deals for old iron [J]. Microbiology Monographs, 2007, 6: 221-233.

GROTZ N, FAX T, CONNCLLY E, et al. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 7220-7224.

GUELDRY O, LAZAAD M, DELORT F, et al. Ycflp-dependent Hg ( II ) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270: 2486-2496.

GUERINOT M L. The ZIP family of metal transporters [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1465: 190-198.

HIRAYAMA T, KIEBER J J, HIRAYAMA N, et al. Responsive-to-antagonists, a Menkes/Wilson disease related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. Cell, 1999, 97: 383-393.

HUSSAIN D, HAYDON M J, WANG Y, et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16: 1327-1339.

JOSE M, ARGUELLO. The structure and function of heavy metal transport  $P_{1B}$ -ATPases [J]. BioMetals, 2007, 20: 233-248.

KATHRYN M, TAYLOR, ROBERT I. NICHOLSON. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1611: 16-30.

KHIPPER H, et al. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 305-312.

KIM D, GUSTIN J L, LAHNER B, et al. The plant CDF family member TgMTP 1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*



- [J]. The Plant Journal, 2004, 39: 237-251.
- KIM D Y, BOVET L, KUSHNIR et al. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2006, 140: 922-932.
- KOBAYASHI Y, UEMURA T, SATO M H, et al. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis [J]. Plant Cell Physiology, 2004, 45: 1749-1758.
- KOIKE S, INOUE H, MIZUNO D, et al. OSYSL2 is a rice metal nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem [J]. The Plant Journal, 2004, 39: 415-494.
- KOLUKISA OGLU H U, BOVET L, KLEIN M, et al. Family business the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2002, 216: 107-119.
- KRAMER U. Polluted phytoremediation: novel approaches to cleaning up soils [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16: 133-141.
- LE JEAN M, SCHIKORA A, MARI S, et al. A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading [J]. The Plant Journal, 2005, 44: 769-782.
- LOPEZ-MILLAN A F, ELLIS D R, GRUSAK M A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula* [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54: 583-596.
- LORRAINE E, WILLIAMS, JON K, et al. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta. 2000, 1465: 104-126.
- MINGORANCE M D, VALDES S. Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions [J]. Environment International, 2007, 33: 514-520.
- MIZUNO T, USUI K, HORIE K, et al. Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their  $\text{Ni}^{2+}$ -transport abilities [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43: 793-801.
- PENCE N S, LARSEN P B, EBBSS D, et al. The molecular physiology of heavy metal transporter in the Zn/ Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4956-4960.
- PERSANS M W, NIEMAN K, SALT D E. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 9995-10 000.
- ROBERTS L A, PIERSON A J, PANAVIENE Z, et al. Yellow stripes expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter [J]. Plant Physiology, 2004, 135: 112-120.
- SANCENON V, PUIG S, MATEU-ANDRES I, et al. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279 (15): 15 348-15 355.
- SANCENON V, PUIG S, MIRA H, et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51: 577-587.
- SCHAAFF G, SCHIKORA A, HABERLE J, et al. A putative function for the *Arabidopsis* Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis [J]. Plant Cell Physiology, 2005, 46: 762-774.
- SEIGNEURIN-BERNY D, GRAVOT A, AUROY P, et al. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 281: 2882-2892.
- SONG W Y, JU SOHN E, MARTINOIA E, et al. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plant [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21: 914-919.
- STEPHAN CLEMENS. MICHAEL G, et al. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7: 309-315.
- TAKAFUMI MIZUNO, KOJI USUI, SYO NISHIDA, et al. Investigation of the basis for Ni tolerance conferred by the expression of TjZnt1 and TjZnt2 in yeast strains [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45: 371-378.
- THOMINE S, WANG R, WARD J M, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4991-4996.

- VERRET F, GRAVOT A, AURCY P, et al. Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal Hisii stretch [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1515-1522.
- VERRET F, GRAVOT A, AURCY P, et al. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance [J]. FEBS Letters, 2004, 576: 306-312.
- VICENTE SANCENON, SERGI PUIG, HELENA MIRA, et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51: 577-587.
- VICTOR KORENKOW, KENDA HIRSCHI, JAMES D, et al. Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increase Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2007, 226: 1379-1387.
- WILLIAMS L E, MILLS R F. P<sub>1B</sub>-ATPases-an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10: 491-502.
- WINTZ H, FOX T, WU Y Y, et al. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (48): 47 644-476 531.
- WOESTE K E, KIEBER J J. A strong loss-of-function mutation in RANT results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype [J]. Plant Cell, 2000, 12: 443-455.
- ZHIXIN L. HUANG, JODI DUFNER-BEATTIE, GLEN K. ANDREWS. Expression and regulation of SLC39A family zinc transporter in the developing mouse intestine [J]. Developmental Biology, 2006, 295: 571-579.





# 生态功能与生态管理

---

Ecosystem Services, Ecosystem Management





# 瑞香狼毒研究综述

黄新会<sup>1</sup> 于福科<sup>2\*</sup> 马永清<sup>3</sup>

(1 西南林学院环境科学与工程系, 昆明 650024; 2 云南大学生命科学学院  
暨云南生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地, 昆明 650091;  
3 中国科学院水利部水土保持研究所, 杨凌 712100)

## Review of Study on *Stellera chamaejasme* L.

Huang Xin-hui<sup>1</sup> Yu Fu-ke<sup>2\*</sup> Ma Yong-qing<sup>3</sup>

(1 Department of Environmental Science & Engineering, South-West Forestry College, Kunming, 650024, China; 2 Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resource & School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China; 3 Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences, Ministry of Water Resources, Yangling 712100, China)

**摘要** 瑞香狼毒 (*Stellera chamaejasme* L.) 长期被视为草地典型害草而被加以防治, 同时又作为独特的中药资源被开发。因此, 在瑞香狼毒的控制和利用的问题上, 一直存在着“泾渭分明”的两种观点。本文综述了瑞香狼毒的自然分布、形态学特征及其他生物学特性, 对瑞香狼毒的化学成分、药用价值、杀虫活性、毒性与危害、预防和控制等方面的研究现状与前景作了述评和分析, 以期对瑞香狼毒的有效控制和合理利用提供一定的理论指导。

**关键词** 瑞香狼毒; 危害; 有效控制; 价值; 合理利用

**Abstract** In the past decades, *Stellera chamaejasme* L. was prevented as typical poisonous weed in pasture. Also, this species was developed because of its unique medicinal values. Therefore, there are two distinctive standpoints about the prevention and utilization of *S. chamaejasme*. In this paper, the natural distribution, morphological characteristics and other biological features of *S. chamaejasme* were summarized. Research progress and perspectives were analyzed systematically from aspects of chemical components, medicinal values, bioactivity against insects, toxicity and harmfulness to people and livestock,

基金项目: 云南省应用基础研究计划面上项目 (2007C022M), 国家“十一五”科技支撑计划课题 (2006BAD09B08) 资助。

\* 通讯作者: gsyfk2006@yun.deu.cn; ylyfk2005@yahoo.com.cn



integrated control of this plant. This study was expected to provide some theoretical guidance for effective control and reasonable use of *S. chamaejasme*.

**Key words** effective control; harmfulness; reasonable use; *Stellera chamaejasme* L.; value

## 1. 前言

瑞香狼毒 (*Stellera chamaejasme* L.) 又名断肠草、山丹花、一把香等, 为瑞香科狼毒属植物。由于瑞香狼毒严重影响牧区人畜的生命安全和草地生态环境健康, 因此长期被视为草地害草而加以重点防治; 同时, 已发现该植物所含的多种化学成分在农业和医药等领域具有独特的应用潜力, 因此如何将其作为资源药用植物进行开发和利用也成为广大学者关注的焦点。可见, 瑞香狼毒是一把“双刃剑”, 致使我们面临这样一个现实——既要有效控制瑞香狼毒, 又要对其进行合理开发。鉴于此, 本文就近年来国内外在瑞香狼毒研发方面的主要进展作简要分析, 以期对探索瑞香狼毒的有效控制和合理利用有所启示。

## 2. 瑞香狼毒概述

### 2.1 自然分布及其在群落中的地位

瑞香狼毒一般生长在海拔 2 300 ~ 4 200 m、年均温度 0 °C 左右的干燥向阳山坡, 以及高山、亚高山草甸草地。在我国西北、西南、东北、华北各省, 以及台湾省等地均有分布, 尤其在青海省、四川省的甘孜州、阿坝州天然草场以及凉山州的西北部分布广泛。在我国不同地带的不同类型草原, 瑞香狼毒在群落中的地位是不同的 (史志诚等, 1997)。如: 内蒙古高原草原地带及松嫩平原、阿尔泰草原区、天山北坡、准噶尔西部山地的瑞香狼毒在群落中占有优势种的地位, 在喜马拉雅山北侧、念青唐古拉山南侧、雅鲁藏布江中游地区为主要种, 在其他地区多为伴生种 (史志诚等, 1997)。

### 2.2 主要的生物生态学特性

现已证实瑞香狼毒具有以下生物生态学特性。

#### 2.2.1 顽强的再生能力

瑞香狼毒地上部分冬季干枯死亡, 以地下根茎越冬。翌年春季四、五月份从宿根中萌发出新的枝条形成株丛, 夏季开花, 夏秋结实, 以种子繁殖后代 (史志诚等, 1997)。马永清把挖自宁夏固原 (半干旱区) 的近百株瑞香狼毒移栽至陕西杨凌 (半干旱半湿润区), 发现该植物在第二年的四月上旬提前返青, 并于五、六月和八月前后两次开花结实。可见, 瑞香狼毒具有很强的再生能力和环境适应能力。

#### 2.2.2 多实性

瑞香狼毒的茎丛生, 每株丛少则有 3 ~ 5 个枝条, 多则可达 20 个以上。每单枝茎顶端生有头状花序, 产种量大。在重度退化的草场, 其结实力远超过其他植物种 (史志诚等, 1997)。

#### 2.2.3 种子生命力强但萌发力弱

瑞香狼毒的果实为坚果, 果皮厚而硬, 落地后进入土层或随风迁移, 一旦遇到适宜萌发的条件, 即可出土形成植株。实际上, 瑞香狼毒种子萌发率较低。种皮障碍是导致狼毒种子萌发率低的主要原因, 破裂或去除种皮能解除部分种子的休眠从而提高其萌发率 (邢福等, 2003)。土壤种子库内的狼毒种子, 只有在适宜萌发条件持续较长时间的情况下才能顺利地地完成萌发; 在自然

条件较为严酷的地区,瑞香狼毒种子的大量萌发和年轻个体的补充多表现出“机会主义”的策略(邢福等,2003)。

#### 2.2.4 极强的抗旱能力和竞争能力

狼毒叶片呈披针形,腊质层较厚,具有对外界水分条件变化作出迅速生理反应的能力,能够忍受长期干旱。据观察,当其他草本植物叶片因极度干旱死亡时,狼毒植株仍枝叶繁茂。狼毒根系粗大,木质且具绵性纤维,入土较深,吸水吸肥能力强。气候干旱时,其根的绵性纤维可以吸收并贮存一定的水分、养分供给地上部以适应不良的环境条件。狼毒地上部丛生枝条多,冠层繁茂,对周围其他植物种产生郁蔽和抑制作用,严重影响群落中其他植物的生长和发育(史志诚等,1997)。

#### 2.2.5 化感作用

研究发现狼毒植株不同部位的水提液或同一部位不同浓度的水提液对几种牧草种子的萌发具有不同程度的抑制作用(周淑清等,1993)。狼毒根残体在腐解过程中对其他植物幼苗的生长有抑制作用,但作用强度随残体腐解时间而变化(周淑清等,1998)。对狼毒抑制作用机制的分析表明,其抑制种子萌发主要是抑制胚根的伸长,使其根尖受害后腐烂死亡,而抑制幼苗生长则是破坏了幼苗的细胞膜透性(周淑清等,1998)。

#### 2.2.6 营养成分

常规化验分析(张建琛,1992)表明:瑞香狼毒茎含纤维 10.23%, $\alpha$ -纤维素 14.33%, $\beta$ -纤维素 1.60%,糅质 11.80%,糠醛 3.84%;根皮含纤维 28.49%, $\alpha$ -纤维素 25.75%, $\beta$ -纤维素 1.16%,糅质 37.30%,糠醛 5.04%,淀粉 8.87%,根部含淀粉 34.77%,去皮后的根含淀粉 66.49%。

### 3. 研究现状与前景

国内外学者对瑞香狼毒作了广泛的研究,主要取得了下述进展。

#### 3.1 化学成分

近 30 年的研究表明,瑞香狼毒的化学成分主要有以下几类物质。

##### 3.1.1 香豆素类化合物

如牛防风素(sphondin)、异佛手内酯(isobergaptin)、茴芹香豆素(pimpinellin)、异茴芹香豆素(isopimpinellin)(Tikhomirova *et al.*, 1984)、伞形花内酯(7-羟基香豆素,umbelliferone)、瑞香内酯(瑞香素、白瑞香素,daphnetin)、西瑞香素(daphnoretin)和东莨菪素(scopoletin)(Modonova *et al.*, 1985)、西瑞香素-7-O-葡萄糖苷(chamaejasmoside)、瑞香苷(白瑞香苷,daphnin)(Narantuyaa *et al.*, 1994)、异西瑞香素(isodaphnoretin)(刘桂芳等,1996)。这些香豆素类化合物多数具有较强的生物活性。

##### 3.1.2 黄酮类成分

如狼毒素(chamaejasmine)、7-甲氧基狼毒素(7-methoxy chamaejasmin)(杨伟文等,1984)、狼毒素 A、B、C(chamaejasmin A, B, C)(Liu *et al.*, 1984)、新狼毒素 A、B(neochamaejasmin A, B)(Niwa *et al.*, 1984a)、异狼毒素(isochamejasmin)(Niwa *et al.*, 1984a)、狼毒素外消旋体 chamaejasmine(*dl*-)、异狼毒素内消旋体 isochamejasmin(*meso*-)(Niwa *et al.*, 1986)、狼毒色原酮(chamaechromone)(Niwa *et al.*, 1984b)、优狼毒素 A、B、C(euchamaejasmenin A, B, C)(Ikegawa & Ikegawa, 1996-11-26)、二氢黄酮类化合物 3',14-二甲基-4',11-二



甲氧基-5,7-二羟基吡二氢黄酮(刘桂芳等, 1995)、二氢黄酮苷类化合物(-)-epiafzelechin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (Jin *et al.*, 1999a)、芫花醇 B 和(-)-表枇杷素。

### 3.1.3 二萜类化合物

如胡拉毒素(huratoxin)、subtoxin A、单纯杆菌素(simplexin)和 pimelea factor P<sub>2</sub> (Niwa *et al.*, 1982)、尼地吗啉(gnidimacrine)及 stelleramacrin (Feng *et al.*, 1991; Feng, 1992)、stelleramacrin A、B (Ikekawa & Ikekawa, 1993-02-18)、neostellin (Eudo *et al.*, 1998-10-2)。

### 3.1.4 木脂体类成分

如鹅掌楸树脂醇 B (lirioresinol B)、松树脂醇(pinoresinol)、罗汉松树脂醇(matairesinol) (Tatematsu *et al.*, 1984)、桉素(eudesmin) (Ikekawa & Ikekawa, 1996-04-26)。

### 3.1.5 其他成分

如 1-苯甲基丙二酮-1,2、正辛烷、肉桂酚、2,6-二甲基庚烷、2,6-二甲基辛烷、5-甲基癸烷、正十二烷、正十三烷、2,5-二甲基十二烷、1-苯基己酮-3 及 3,7,11-三甲基十二碳-2-反-6-顺-10-三烯醇和 1-苯基己酮-3,7,10-十八二烯酸甲酯(杨伟文等, 1985)、coniferinoside、丁香苷(syringin)、syringinose、sinapylaldehyde-1,3-diglucopyranoside [4-(3- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-1-E-propenyl)-2,6-dimethoxyphenyl]-6-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside 和 [4-(3-hydroxy-1-Z-propenyl)-2,6-dimethoxyphenyl]-6-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (Jin *et al.*, 1999b)。

此外,从瑞香狼毒根中分离并鉴定出 $\beta$ -谷甾醇和胡萝卜苷等(刘桂芳等, 1995)。曾测定总黄酮含量为 11.7 mg/g (邢有权等, 1992), 总酸性成分含量为 17.7 mg/g (孙志忠等, 1996b), 总糖类成分含量为 25.6 mg/g (孙志忠等, 1996a), 均高于大戟狼毒。还发现瑞香狼毒含有锌、铜、砷、铅、镍、汞、钛等微量元素(杨东红等, 1996)。

## 3.2 药用价值

据《中药大辞典》记载,瑞香狼毒的干燥根性味苦平,有逐水祛痰、破积杀虫之功效。现代药理学和临床研究表明瑞香狼毒具多种药用价值,分述如下。

### 3.2.1 抗肿瘤作用

据杨宝印等(1986)报道,瑞香狼毒醇提物 80.66 mg/kg 腹腔注射 8 d、水提物 10.48 g/kg 腹腔注射 10 d,对小鼠移植性 Lewis 肺癌抑制率分别为 70.2% 和 59.9%;水溶物 1.5 g/kg 腹腔注射 8 d,对小鼠移植性宫颈癌 U<sub>14</sub>、肉瘤 S<sub>180</sub> 及肝癌的抑制率分别为 48.5%, 30.1% 及 36.7%;挥发物 45 g/kg 腹腔注射 7 d,对肝癌和 U<sub>14</sub> 的抑制率分别为 42.5% 和 50.5%。其抑瘤效果与农吉利(40.2%)、去甲基斑蝥素(38.2%)、氟脲嘧啶(39.0%)、长春新碱(43.8%)等相当或略高,因而认为该药具有显著的抗癌作用。冯威健等(1995)、Yoshida 等(1996)对尼地吗啉、huratoxin、subtoxin A、simplexin、pimelea factor P<sub>2</sub> 等 7 种抗癌活性成分进行了抗癌活性实验,发现尼地吗啉的抗癌活性最强,并认为尼地吗啉是瑞香狼毒的主要抗癌活性成分。

### 3.2.2 抗菌、抗病毒作用

瑞香狼毒的有效成分狼毒素为一抗菌性物质,能抑制真菌、金黄色葡萄球菌与链球菌的生长。早期研究发现 1/1000 浓度的狼毒煎剂对人形结核杆菌即有明显的抑制作用。狼毒水浸剂(1:3)在试管内对黄色毛癣菌、同心性毛癣菌、铁锈色小芽孢癣菌、许兰氏黄癣菌、奥杜盎氏小芽孢菌、羊毛状小芽孢癣菌、腹股沟表皮癣菌、星形奴卡氏癣菌等皮肤真菌均有不同程度的抑制作用(林馨和朱君华, 1992)。此外,有研究表明优狼毒素 A、B、C 具抗病毒尤其抗 HIV 病毒的作用(Ikegawa & Ikegawa, 1996-11-26), neostellin 具抗 HIV-1 病毒作用(Eudo *et al.*,

1998-10-27)。瑞香狼毒的抗肿瘤成分尼地吗啉也具有较强的抗病毒作用, 特别对艾滋病毒有较强的活性 (Ikekawa & Ikekawa, 1996-04-26), 已引起医学界的广泛关注。

### 3.2.3 抗惊厥、抗癫痫作用

张美妮等 (2002) 首次发现瑞香狼毒具有抗癫痫活性, 其六种粗提物对多种动物惊厥模型均有不同程度的抗惊厥作用, 其中丙酮提取物抗癫痫作用更强, 毒副作用更小。实验结果表明瑞香狼毒能有效对抗最大电休克惊厥发作, 延长戊四唑诱发的惊厥发作潜伏期, 提高惊厥阈值, 延长惊厥小鼠的存活时间, 降低死亡率; 对声源性惊厥发作也有较好的对抗作用; 亦能明显提高刺激大鼠皮层运动区诱发惊厥阈值, 进一步肯定该药具有抗惊厥作用。

### 3.2.4 对免疫系统的作用

胡垠玲 (1990) 报道狼毒对 Raji 细胞内 EB 病毒有非常明显的诱导作用, 并能显著地促进 EB 病毒对淋巴细胞的转化。还报道瑞香狼毒与促癌物 TAP 一样, 能促进腺病毒 5 型转化鼠胚细胞。从而证明狼毒不仅对 EB 病毒有激活作用, 而且对腺病毒转化细胞也有促进作用, 等等 (樊俊杰等, 2000)。

在临床上, 应用瑞香狼毒治疗肿瘤 (杨宝印和陆凤翔, 1989)、结核病 (徐延良, 1986; 郭志广和徐金莲, 1990)、多种皮肤病 (司再和, 1989; 郭玉波, 1986; 孙博郎和张明昕, 2002)、坐骨神经痛 (申玉通, 1987)、牛肉绦虫病 (赵国儒, 1985)、妇科病 (张学录, 1998; 石桂英, 2002) 等已取得了成功。

毋庸置疑, 瑞香狼毒用于开发抗癌、抗艾滋病等药物有很好的前景。然而, 从现有的研究发现, 目前对瑞香狼毒药理作用与主成分的关系研究很少。因此, 以后应加强该领域的研究工作, 其意义在于推动瑞香狼毒在医药领域的应用。

## 3.3 杀虫活性

瑞香狼毒对农林害虫、仓储害虫、家畜寄生虫等具有一定的生物活性。

### 3.3.1 对农林害虫的生物活性

张国洲就瑞香狼毒对作物和蔬菜主要害虫的生物活性研究取得了较为系统的结论。简要归纳如下:

狼毒乙醇提取液 (简称 SCEE) 对菜粉蝶幼虫、亚洲玉米螟幼虫、桃蚜具有很强的生物活性, 但对斜纹夜蛾幼虫、小菜蛾幼虫的生物活性弱 (张国洲等, 2000e)。当 SCEE 浓度分别为 10, 50, 2.5 mg/mL 时, 处理 7 d 后亚洲玉米螟 3 龄幼虫、斜纹夜蛾 3 龄幼虫和小菜蛾 3 龄幼虫的校正死亡率分别为 65.52%, 16.67% 和 31.03%; SCEE 对桃蚜 48 h 的  $LC_{50}$  值 (半数致死浓度) 为 0.5992 mg/mL。

1.5% SCEE 对菜粉蝶的产卵有较强的忌避作用, 施药后第 1, 2, 3, 5 天的产卵忌避率分别为 77.59%, 64.29%, 52.46%, 31.23%, 但 1.5% SCEE 对菜粉蝶的杀卵作用差 (张国洲等, 2000b)。

用 SCEE 丙酮稀释液点滴菜粉蝶各虫态, 发现其触杀作用较差, 且作用缓慢; 但将 SCEE 从幼虫腹部注入其体内, 毒杀效果好, 且作用快。从而推断其触杀作用差的原因是 SCEE 不能穿透体壁, 进入昆虫体内。故在应用 SCEE 防治菜粉蝶时, 可适当加入渗透剂, 以提高其防效能力 (张国洲等, 2000a)。

1.0% 的瑞香狼毒甲醇提取物与 SCEE 对菜粉蝶 5 龄幼虫 24 h 的拒食率分别为 92.29% 和 97.06%, 7 d 的校正死亡率分别为 82.76% 和 100%。SCEE 对菜粉蝶 5 龄幼虫 24 h 的  $AFC_{50}$  值 (非选择性拒食浓度) 为 381.28  $\mu$ g/mL。SCEE 对菜粉蝶 5 龄幼虫 12, 24, 48 h 的胃毒作用  $LD_{50}$



值(致死中量)分别为 56.97  $\mu\text{g}/\text{头}$ 、22.42  $\mu\text{g}/\text{头}$ 、12.32  $\mu\text{g}/\text{头}$ ; 用 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SCEE 石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物浸过的叶碟饲喂菜粉蝶 5 龄幼虫, 24 h 后的拒食率分别为 89.53%, 93.58%, 27.81%,  $\text{AFC}_{50}$  值分别为 199.93  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 165.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1079.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (张国洲, 1999)。

SCEE 对室外菜粉蝶有很好的防效。盆栽试验中, 1.5% SCEE 在施药后 1, 3, 7, 14 d 对菜粉蝶幼虫的防效分别为 52.62%, 75.85%, 87.68%, 76.39%, 施药后 5, 10 d 对甘蓝的保叶率分别为 83.47% 和 89.83%。田间小区试验中, 1.5% SCEE 在施药后 1, 3, 7, 14 d 对菜粉蝶幼虫的防效分别为 51.59%, 74.01%, 78.13%, 75.01%, 施药后 28 d 对甘蓝的保叶率为 97.76% (张国洲和吴恭谦, 2000)。

从 SCEE 氯仿萃取物中得到伞形花内酯、瑞香亭和狼毒色原酮 (张国洲等, 2000c), 从其石油醚萃取物中得到  $\beta$ -谷甾醇 (张国洲等, 2000d)。瑞香亭、狼毒色原酮和  $\beta$ -谷甾醇对菜粉蝶 5 龄幼虫 24 h 的  $\text{AFC}_{50}$  值分别为 160.57  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 229.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 283.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (张国洲等, 2002)。用 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的瑞香亭、伞形花内酯和狼毒色原酮浸过的叶碟饲喂菜粉蝶 5 龄幼虫, 24 h 后的拒食率分别为 80.45%, 83.79% 和 70.03%, 7 d 后试虫的死亡率分别为 75.87%, 79.31% 和 65.52% (张国洲等, 2002)。

从昆虫对瑞香狼毒活性成分的生理生化响应入手, 研究了  $\beta$ -谷甾醇、瑞香亭和狼毒色原酮的作用机制。结果表明, 三种活性物质破坏昆虫中肠的组织结构; 抑制昆虫血淋巴酯酶的多数主酶带, 加强少数主酶带, 诱导出个别新酶带; 在一定程度上影响昆虫中肠酯酶活力、整体昆虫的糖源、血淋巴总糖含量、血淋巴蛋白质含量等, 从而干扰昆虫体内正常的物质合成和能量转化 (张国洲等, 2000f)。

除张国洲的研究外, 高平等 (2001) 报道瑞香素对农业上重要的几类蚜虫具有很好的触杀作用和较好的拒食作用。瑞香素对棉蚜、桔蚜和烟蚜 24 h 的  $\text{LD}_{50}$  分别为 ( $29.48 \pm 1.55$ ), ( $30.75 \pm 1.50$ ) 和 ( $95.88 \pm 2.06$ )  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 拒食作用的  $\text{AFC}_{50}$  分别为 ( $0.4664 \pm 0.0137$ ), ( $0.4219 \pm 0.0213$ ) 和 ( $0.5847 \pm 0.0172$ )  $\text{g}/\text{L}$ 。田间小区试验表明, 瑞香素防治棉蚜效果显著。

曹挥等 (2003) 的研究指出, 瑞香狼毒的氯仿、石油醚、甲醇提取物对山楂叶螨有很好的触杀和内吸作用。对氯仿提取物处理后成螨体内几种酶系活性测定发现, 在内吸处理中, 其对蛋白酶、谷胱甘肽-S-转移酶, 酯酶同功酶有不同程度的激活作用; 触杀处理中, 对蛋白酶、谷胱甘肽-S-转移酶影响不明显, 对酯酶同功酶有一定的抑制作用。

杨丽娟 (2004) 的研究显示, 300  $\text{g}/\text{L}$  瑞香狼毒水提液及其 4 倍以下的稀释液, 对落叶松鞘蛾幼虫的毒杀作用很强, 且毒杀作用在 20 h 后最显著; 用冷水提取的母液和稀释液, 其毒杀作用强于用热水提取的母液和稀释液。

吕全等 (2004) 测定了狼毒根提取物的生物活性, 结果表明, 0.10, 0.05  $\text{mg}/\text{L}$  狼毒根水浸液对杨树舞毒蛾幼虫 48 h 的拒食率分别为 82.1% 和 78.0%, 7 d 校正死亡率分别为 83.3% 和 66.7%。0.02, 0.01  $\text{mg}/\text{L}$  SCEE 对舞毒蛾幼虫 48 h 的拒食率分别为 99.0% 和 90.2%, 7 d 校正死亡率分别为 100% 和 83.3%。SCEE 氯仿萃取物和石油醚萃取物对油松毛虫 48 h 的拒食率分别为 92.4% 和 91.2%, 7 d 校正死亡率分别为 100% 和 94.7%。

### 3.3.2 对仓储害虫的生物活性

唐川江等 (2001) 指出瑞香狼毒根粉剂对米象、玉米象、谷蠹等仓储害虫有较好的防治效果。SCEE 在 1.5  $\text{g}/\text{kg}$  的剂量下, 对米象的致死率为 91%, 而狼毒正己烷提取液在 0.5  $\text{g}/\text{kg}$  的剂

量下,对米象的致死率仍高达98%。进一步从瑞香狼毒根中分离纯化得到了一种具有较高杀虫活性物质的纯样品(唐川江等,2001)。说明瑞香狼毒在仓储害虫防治方面有很好的应用前景。

### 3.3.3 对家畜等寄生虫的生物活性

杨英等(2001)的实验研究表明瑞香狼毒对猪虱的杀灭作用优于百部。2.5%瑞香狼毒乙醇浸渍液作用于猪虱2 min后即有杀灭效力,并且随浓度的提高,效果增强,当达到10%时可全部杀灭,而百部乙醇浸渍液浓度达20%时对猪虱杀灭效果最佳。

李德龙(2003)用狼毒煎剂和擦剂治愈了牛羊螨病多例。杨英等(2003)证实用拌有狼毒粉末的饲料喂养幼鸡治疗其体内球虫有一定效果。还有研究表明狼毒浇泼剂对小白鼠体内外寄生虫有驱杀作用(杨英和温立彬,2000)。

根据农业部药检所提出的农药发展新方向,即采用科学的方法将植物源农药与化学低毒农药复配,既保持了植物源农药持效性长的优点和低毒化学农药速杀性强的特点,也减少了环境污染,同时降低了成本。瑞香狼毒杀虫活性物质,用于农药的中间体原料,将会以独特的优势加入生化复配农药行列,市场潜力巨大。

显然,应用瑞香狼毒开发高效、低毒、无公害的生物杀虫剂或农药的前景广阔。但是,目前对相关领域的基础研究比较薄弱。以后需在瑞香狼毒杀虫活性物质结构及其作用机理的分析方面深入开展实验研究,这有利于扩大瑞香狼毒在农业生产中的应用。

### 3.4 毒性与危害

瑞香狼毒全株有毒,尤以根的毒性最大。牛羊易发生误食中毒,马和其他家畜很少发生中毒。每年早春,牛羊抢青误食狼毒常引起呕吐、腹痛、腹泻、四肢无力、卧地不起、全身痉挛、头向后弯、心悸亢进、粪便带血等中毒症状,严重时虚脱甚至死亡。狼毒还可造成母畜怀胎率低,易引起流产和畸胎。人接触可引起过敏性皮炎,根粉、花粉对人眼、鼻、喉有较强烈而持久的辛辣性刺激。

瑞香狼毒与牧草争水、争肥、争空间,严重影响草场的利用及牧草的品质和繁衍,引起草场退化,实为我国天然草场一大祸害。据调查,甘肃有46.6 hm<sup>2</sup>草原遭受危害,牧草减产1.375亿kg,经济损失近1 500万~2 000万元(李扬汉和韩学俊,1995)。青海天然草场生长瑞香狼毒的面积达73.3万hm<sup>2</sup>,密度为每百平方米350株丛,最多可达1 998~5 000株丛(陆元彪等,1995)。内蒙古已形成以瑞香狼毒为主要植物群落的草场约4万hm<sup>2</sup>,有瑞香狼毒生长的草场约13.3万hm<sup>2</sup>以上(黄祖杰和周淑清,1993)。

### 3.5 预防与控制

瑞香狼毒作为草地群落中的一个组成部分,其繁衍、生长受多种因素影响,因而在对其进行治理时也应综合考虑各种因素的作用,采用多种措施,才能达到全面治理的效果,减少狼毒对草地畜牧业造成的损失。

#### 3.5.1 合理放牧

长期以来,由于人类不合理的利用,造成天然草地退化,使优良牧草日趋荒芜、衰退甚至灭绝,而有毒植物得以滋生蔓延。邢福和宋日(2002)对草地狼毒种群分布格局及动态的研究表明:在过牧、重牧、极牧的压力条件下,随着放牧强度的增大,草地群落中狼毒的盖度也随之增大。因而在狼毒的治理中,首先应考虑合理放牧,采取划分轮牧、转场放牧等措施,控制草地载畜量,以防止草地退化,抑制狼毒发生和发展。但在生产实践中,由于缺乏相应的政策、法规保障,科学的放牧制度往往得不到有力的执行。

#### 3.5.2 物理防除



物理防除包括机械铲除、人工挖除、刈割等技术手段。

(1) 机械铲除。该方法适用于狼毒小面积发生的草地、坡地、高山。铲除狼毒的时间最好选择在狼毒返青的前期或中期以及雨季(史志诚等, 1997)。机械铲除需花费大量的人力、物力和财力, 因此具有一定的局限性。

(2) 人工挖除。这种方法简单易行, 成本低, 一般在狼毒面积小、数量少时采用。人工挖除狼毒应在幼苗期进行, 可防止成熟种子的散落、传播。牧民可边放牧边挖除狼毒, 既能减少狼毒对人畜的危害, 又能增加经济收入。人工挖除狼毒也应像化学防除一样结合补播进行, 才能更有利于退化草地的恢复。人工挖除方法的缺点也是显而易见的, 如效率低、破坏草地生态环境等。

(3) 刈割。对狼毒进行多次刈割以耗竭其生机, 削弱其营养更新, 杜绝结籽并使其根部营养得不到补充, 糖分积累不足, 使其越冬能力大幅度降低, 以达到逐步淘汰根除的目的。刈割需要经历一个很长的时期, 故收效较慢。

### 3.5.3 化学防除

该方法适宜在狼毒大肆泛滥的情况下采用。化学防除有见效快、利于水土保持、不受地形限制等优点, 但其经济成本比较高, 而且容易造成环境污染。

目前防除狼毒较为有效的化学药物有草甘膦、使它隆、2,4-D 丁酯等叶面处理剂。据有关实验研究(陆元彪等, 1995), 施用草甘膦的狼毒植株, 7 d 后叶面变黄, 15~25 d 后地上部干枯, 30 d 后地上部开始缩水变干, 维管束内出现黑色斑点, 次年根部呈腐烂状。当草甘膦浓度为 3~4 mL/L (商品量) 时, 大面积施用防治效果达 91.0% 以上。喷施使它隆的狼毒, 在 3 h 后茎叶下垂, 3 d 后褪绿萎缩, 整株倒伏, 5~7 d 整株开始死亡, 使用浓度以 0.5~0.8 mL/L 为最佳, 大面积使用灭除率可达 90% 左右。喷施浓度为 0.8 mL/L 的 2,4-D 丁酯, 3 d 后有 90.2% 的狼毒植株被杀死, 第 2 年返青率为 0, 根部全部坏死, 灭除效果理想。可是, 这些化学药品所引起的环境问题同样显著, 从而使其应用受到很大限制。

采用化学防除时, 首先要考虑狼毒是以种子繁殖的特性, 施药时间应选择狼毒初蕾期或盛花期, 以防止狼毒种子成熟和结实扩散繁殖, 从而减少土壤中种子基数; 而且还须连续喷施 3 年, 以彻底灭除土壤中种子萌发出的幼苗。沈景林等(2000)连续 3 年采用两种复合剂(2,4-D 丁酯 400 mL/hm<sup>2</sup>与百草敌 200 mL/hm<sup>2</sup>, 2,4-D 丁酯 300 mL/hm<sup>2</sup>与绿磺隆 80 g/hm<sup>2</sup>)防除狼毒, 灭除率达 90% 以上。然而, 考虑到对人畜生命与环境安全的潜在威胁, 此类研究成果未被广泛应用于生产实践。

在自然条件较为恶劣的地区, 很少见到被灭除狼毒的草地能在较短时期内自然恢复植被, 因此, 通过药物灭除狼毒后还应及时补播其他植物, 以改变生长地的环境条件。由于狼毒对其他植物具有化感作用, 因而在补播时应选择对狼毒化感作用具有高抗性的牧草种子。一般而言, 禾本科植物对狼毒化感作用的抗性大于豆科植物(周淑清等, 1993)。

### 3.5.4 生物防除

生物防除的目标并不是在短时期内根除狼毒, 而是根据群体生态学的可靠原理, 使狼毒在草地植被中的多度减少到经济学上或美学上可以允许的水平。在狼毒受到抑制期间, 其他植物种得以复壮, 恢复植被, 提高草地生产力。

据报道, 狼毒植株上有蚜虫寄生并为害(黄祖杰和周淑清, 1993), 其中 *Aphis brachychaeta* 为主要的种, 寄生在狼毒植株的茎、叶片上。有蚜虫寄生的狼毒茎叶褪绿, 植株矮小, 体内含水量及营养成分低于未受害植株。在狼毒上也发现有锈菌感染(姚拓等, 2004), 这种菌可以抑制狼毒的生长发育, 严重发生时, 可导致结实率下降, 并影响翌年的返青。这些报道只是对一些自

然现象的初步认识,必须对其内在机理做深入、系统的研究,方可解决狼毒天敌的引进、释放、定居、保存和繁殖等技术环节上的难点,从而为瑞香狼毒的生物防治提供充分的技术支撑。

20 世纪七八十年代,我国西北地区退化草地的生态恢复实践表明,人工补播沙打旺对瑞香狼毒具有较好的替代控制效果。在沙打旺人工种群大量进入草原百里香群落后,促使百里香群落短时间内(9~10 年)演替到长芒草顶级群落(邹厚远等,1990)。在此演替过程中,瑞香狼毒的繁衍受到抑制,由群落的主要伴生种转为次要伴生种(邹厚远等,1994)。由于沙打旺生长迅速而过度消耗了土壤水分,致使土壤质量下降和草地生态系统再度退化,故选择沙打旺控制草地瑞香狼毒仍有一定的“后顾之忧”。另外,过去普遍将沙打旺替代控制瑞香狼毒的机理归于种间竞争,但近期有研究指出:沙打旺对瑞香狼毒显示出化感抑制作用(于福科,2006)。这表明沙打旺的化感作用也是其替代控制瑞香狼毒的新武器。

最后还需强调:在杂草控制中,由于单一的技术手段往往不能取得良好的防治效果,因此,采用多种途径开展瑞香狼毒的综合防治尤为重要。

#### 4. 结束语

瑞香狼毒是一种有毒植物,主要分布于天然草场,对人畜的生命与环境的安全危害严重。天然草场的狼毒越多,草场植被的载畜力越低。所以,开发该有毒植物对优化天然草地资源意义重大。但从前文总结的内容可以看出,目前的研究工作主要集中于基础研究领域,而工程方面的开发研究报道较少,例如有效成分提取和分离技术的开发研究等。狼毒具有多种药理作用,这是作为一种药物的独特优势,但这些作用能否发挥和应用,关键还在于活性组分的提取与分离。应该把更多的精力投入到研究高效低毒物质的提取与分离技术上,这样才有可能获得有价值的活性物质,才有可能开发出新的抗病药物。

对瑞香狼毒的大量采挖严重破坏了草地的生态环境,故有学者呼吁加强对瑞香狼毒地上部化学成分、药理作用的研究,探索瑞香狼毒地上部作为药物原料的可行性,并强调此项研究对于保护环境和合理利用资源意义深远(魏春雁,2001)。

天然草场上狼毒的广泛分布实际上是草场退化的一种标志。但在退化草地恢复过程中,瑞香狼毒种群又将从草地植被群落中逐渐消失。在我国,随着大面积退化草地的恢复与重建,瑞香狼毒源植物资源将变得短缺甚至灭绝。鉴于这种潜在危机,有学者尝试采用人工种植与栽培手段繁殖瑞香狼毒,但未见成功。瑞香狼毒虽以种子繁殖后代,但种皮障碍和种子质量低劣严重影响其种子的萌发,即使萌发的种子也很难在自然条件下成活,导致种苗繁殖难度大幅度增加。笔者以瑞香狼毒茎尖作为外植体,采用琼脂固体培养方法,研究该植物的组织培养,成功获取了其再生植株(于福科等,2005)。这为瑞香狼毒种质资源的保存开辟了一条有效途径,并为其种苗繁殖及工厂化生产提供了有力的技术支撑。

#### 参考文献

- 曹挥,刘素琪,赵莉茜,等.瑞香狼毒提取物对山楂叶螨的生物活性及酶活性影响[J].林业科学,2003,39(1):98-102.
- 樊俊杰,贾正平,谢景文,等.瑞香狼毒多糖对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响[J].西北国防医学杂志,2000,21(4):263-265.



- 冯威健, 池川哲郎, 吉田光二. 瑞香狼毒提取物尼地吗啉的抗癌活性 [J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17 (1): 24.
- 高平, 刘世贵, 侯太平, 等. 瑞香素对蚜虫生物活性的研究 [J]. 植物保护学报, 2001, 28 (3): 265-268.
- 郭玉波. 狼毒治疗牛皮癣 250 例 [J]. 河北中医, 1986, (4): 20.
- 郭志广, 徐金莲. 狼毒治疗耐药肺结核 10 例报告 [J]. 湖南中医学院学报, 1990, 10 (4): 223-224.
- 胡垠玲. 狼毒对免疫系统的作用 [J]. 病毒学报, 1990, (3): 224.
- 黄祖杰, 周淑清. 草地重要有毒植物——狼毒 [J]. 四川草原, 1993, (4): 24-27.
- 李德龙. 试用狼毒煎剂和擦剂治疗牛羊螨病 [J]. 青海畜牧兽医杂志, 2003, 33 (4): 51.
- 李扬汉, 韩学俊. 应重视对有毒杂草狼毒的综合治理 [J]. 植物杂志, 1995, (6): 4-5.
- 林磐, 朱君华. 狼毒的药理研究与临床应用概况 [J]. 浙江中医杂志, 1992, 27 (7): 331-333.
- 刘桂芳, 赵瑞凌, 付玉芹. 瑞香狼毒化学成分研究 [J]. 中草药, 1996, 27 (2): 67.
- 陆元彪, 周翰信, 殷显智. 海北藏族自治州草原毒草棘豆、狼毒调查报告 [J]. 四川草原, 1995, (4): 29-31.
- 吕全, 贾秀贞, 梁军, 等. 狼毒根提取物的生物活性测定 [J]. 林业科学研究, 2004, 17 (4): 447-452.
- 沈景林, 孟扬, 谭刚, 等. 应用除草剂防除草地狼毒对草地植被的影响研究 [J]. 中国草地, 2000, 22 (4): 48-50.
- 申玉通. 狼毒药酒治疗坐骨神经痛 50 例 [J]. 河北中医, 1987, (4): 20.
- 石柱英. 狼毒汤加碱治疗滴虫性阴道炎 50 例 [J]. 国医论坛, 2002, 17 (3): 22.
- 史志诚, 李祚煌, 邹康南, 等. 中国草地重要有毒植物 [M]. 北京: 农业出版社, 1997: 140-150.
- 司再和. 浅谈狼毒在皮肤病的应用 [J]. 吉林中医药, 1989, (4): 36.
- 孙博郎, 张明昕. 狼毒膏治疗神经性皮炎 [J]. 中国民间治疗, 2002, 10 (1): 29-30.
- 孙志忠, 黎勇, 郝文辉, 等. 瑞香狼毒和大戟狼毒糖类成分的比较研究 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 1996a, 13 (4): 88-91.
- 孙志忠, 黎勇, 郝文辉, 等. 瑞香狼毒和大戟狼毒总酸性成分的比较研究 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 1996b, 13 (3): 79-81.
- 唐川江, 侯太平, 陈放. 瑞香狼毒防治仓储害虫的初步研究 [J]. 粮食储藏, 2001, 30 (4): 11-13.
- 魏春雁. 瑞香狼毒化学成分与生物活性研究的回顾与展望 [J]. 中国药学杂志, 2001, 36 (9): 577-580.
- 邢福, 郭继勋, 王艳红. 狼毒种子萌发特性与种群更新机制的研究 [J]. 应用生态学报, 2003, 14 (11): 1851-1854.
- 邢福, 宋日. 草地有毒植物狼毒种群分布格局及动态 [J]. 草业科学, 2002, 19 (1): 16-19.
- 邢有权, 孙志忠, 马东升, 等. 瑞香狼毒和大戟狼毒总黄酮成分比较研究 [J]. 现代应用药学, 1992, 9 (2): 60-63.
- 徐延良. 狼毒枣治疗肺结核 16 例 [J]. 浙江中医杂志, 1986, (2): 67.
- 杨宝印, 贾宝山, 杨正裕. 瑞香狼毒对小鼠移植性肿瘤的抑制作用 [J]. 中药通报, 1986, 11 (1): 58.
- 杨宝印, 陆风翔. 瑞香狼毒治疗恶性肿瘤 54 例 [J]. 中西医结合杂志, 1989, 9 (11): 683, 685.
- 杨东红, 何郁芳, 刘伟. 狼毒微量元素的测定 [J]. 适宜诊疗技术, 1996, 14 (53): 51-52.
- 杨丽娟. 几种有毒植物提取液对落叶松松蛾幼虫的毒杀作用 [J]. 通化师范学院学报, 2004, 25 (2): 80-82.
- 杨伟文, 李兆琳, 杨玉成, 等. 瑞香狼毒化学成分研究 (V) 挥发油化学成分研究 [J]. 中药通报, 1985, 10 (12): 31-32.
- 杨伟文, 邢有权, 宋茂森, 等. 7-甲氧基狼毒素的分离与结构鉴定 [J]. 高等学校化学学报, 1984, 5 (5): 671-673.
- 杨英, 郭镇华, 李毅. 瑞香狼毒和百部醇浸液对猪虱杀灭作用的比较研究 [J]. 动物科学与动物医学, 2001, 19 (5): 34-35.
- 杨英, 孙俭辰, 王小刚. 瑞香狼毒饲料添加剂对鸡增重及抗球虫作用的研究 [J]. 中兽医学杂志, 2003, (6): 10-12.
- 杨英, 温立彬. 瑞香狼毒浇泼剂驱杀小白鼠体内外寄生虫试验 [J]. 中国兽医科技, 2000, 30 (9): 24-26.

- 姚拓,寇建村,刘英. 狼毒栅锈病调查及其用于控制狼毒的初步研究 [J]. 中国生物防治, 2004, 20 (2): 1423-144.
- 于福科,马永清,李秀维. 瑞香狼毒组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41 (1): 59.
- 于福科. 沙打旺抑制瑞香狼毒的化感作用机理 [D]. 陕西杨凌: 中国科学院教育部水土保持与生态环境研究中心, 2006.
- 张国洲. 瑞香狼毒的杀虫活性和有效成分研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 1999.
- 张国洲,陈于年,王亚维,等. 瑞香狼毒根提取物对菜粉蝶幼虫的触杀作用 [J]. 华中师范大学学报, 2000a, 34 (4): 460-462.
- 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒根提取物对菜粉蝶的产卵忌避与杀卵作用 [J]. 安徽农业科学, 2000b, 28 (5): 623, 628.
- 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分的提取与分离 (I) [J]. 安徽农业大学学报, 2000c, 27 (4): 340-344.
- 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分的提取与分离 (II) [J]. 安徽农业大学学报, 2000d, 27 (4): 345-347.
- 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒提取物对昆虫的生物活性研究 [J]. 湖南农业大学学报, 2000e, 26 (3): 190-192.
- 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分对昆虫生理生化的影响 [J]. 湖南农业大学学报, 2000f, 26 (5): 366-368.
- 张国洲,吴恭谦. 瑞香狼毒根提取物防治菜粉蝶试验 [J]. 农业科学与管理, 2000, 21 (6): 29-31.
- 张国洲,徐汉虹,王亚维. 瑞香亭等化合物对昆虫的生物活性测定 [J]. 青海大学学报, 2002, 20 (1): 23-24.
- 张建琛. 浅谈狼毒资源的开发与利用 [J]. 中国野生植物, 1992, (2): 36-37.
- 张美妮,刘玉玺,孙美珍,等. 瑞香狼毒丙酮提取物抗惊厥作用研究 [J]. 中国药物与临床, 2002, 2 (1): 18-21.
- 张学录. 狼毒汤熏洗治疗阴痒 30 例 [J]. 中医外治杂志, 1998, 7 (2): 44-45.
- 赵国儒. 狼毒治疗牛肉绦虫病 20 例 [J]. 中国人兽共患杂志, 1985, 1 (1): 58.
- 周淑清,黄祖杰,阿荣. 狼毒异株克生现象的初步研究 [J]. 中国草地, 1998, 20 (4): 52-55.
- 周淑清,侯天爵,黄祖杰. 狼毒水浸液对几种主要牧草种子发芽的影响 [J]. 中国草地, 1993, 15 (4): 77-79.
- 邹厚远,鲁子瑜,关秀崎,等. 黄土高原草地生产持续发展研究—II. 补播沙打旺对退化草地演替的影响 [J]. 中国科学院水利部西北水土保持研究所集刊, 1990, (11): 77-83.
- 邹厚远,鲁子瑜,张鹏,等. 沙打旺种群对草原植被演替影响试验研究 [J]. 水土保持研究, 1994, 1 (3): 61-64, 68.
- EUDO Y, MARUNO M, MIURA N. Novel diterpenes and their use as antiviral and anti-HIV agents with low toxicity [P]. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 10 287, 617 [98 287, 617] (Cl. C07C69/21), 1998-10-27.
- FENG W J. Studies on antitumor active compounds of *Stellera chamaejasme* L. and their mechanism of action [J]. Toho Igokkai Zasshi, 1992, 38 (6): 896.
- FENG W J, ZHANG H L, LI L F. Studies on antitumor Chinese medicines (II). Antitumor constituents of *Stellera chamaejasme* L. [J]. Wakan Iyaku Gakkaishi, 1991, 8 (2): 96.
- IKEGAWA T, IKEGAWA A. Chamaejasmin and euchamaejasmin extraction from *Stellera chamaejasme* and their antiviral activities [P]. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 08 311, 056 [96 311 056] (Cl. C07D311/32), 1996-11-26.
- IKEGAWA T, IKEGAWA A. Extraction of anticancer and antiviral substances from *Stellera chamaejasme* [P]. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 08 310, 993 [96 310, 993] (Cl. C07C69/21), 1996-04-26.
- IKEGAWA T, IKEGAWA N. Carcinostatic compounds and production thereof [P]. PCT Int 93, 03, 039 (Cl. C07D493/18), 1993-02-18. Appl WO 93, 03, 039 (Cl. C07D493/18), 1993-02-18.
- JIN C D, MICHETICH R G, DANESHTALAB M. Flavonoids from *Stellera chamaejasme* [J]. Photochemistry, 1999a,



50 (3): 505.

- JIN C D, RONALD M G, MOHSEN D. Phenylpropanoid glucosides from *Stellera chamaejasme* [J]. Photochemistry, 1999b, 50 (4): 677.
- LIU G Q, TATEMATSU H, KUROKAWA M. Novel C-3/C-3' -biflavanones from *Stellera chamaejasme* L. [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1984, 32 (1): 362-365.
- MODONOVA L D, ZHAPOVA T S, BULATOVA N V. Coumarins from *Stellera chamaejasme* L. [J]. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 1985, (5): 709.
- NARANTUYAA S, BATSUREN D, RASHKES Y. Chemical study of plants of Mongolia: coumarins of *Stellera chamaejasme* structure of chamaejasmoside, a new bicoumarin glucoside [J]. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 1994, (2): 216.
- NIWA M, CHEN X F, LIU G Q, et al. Structures of isochamaejasmin from *Stellera chamaejasme* [J]. Chemistry Letters, 1984a, (9): 1587-1590.
- NIWA M, LIU G Q, TATEMATSU H, et al. Chamaerchromone, a novel rearranged biflavonoid from *Stellera chamaejasme* [J]. Tetrahedron Letters, 1984b, 25 (34): 3735-3738.
- NIWA M, OTSUJI S, TATEMATSU H. Stereostructures of two biflavanones from *Stellera chamaejasme* [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34 (8): 3249.
- NIWA M, TATEMATSU H, LIU G Q, et al. Isolation and structures of two new C-3/C-3' -biflavanones, neochamaejasmin A and neochamaejasmin B [J]. Chemistry Letters, 1984c, 148 (4): 539-542.
- NIWA M, TAKAMIZAWA H, TATEMATSU H, et al. Piscicidal constituents of *Stellera chamaejasme* L. [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1982, (30): 4518-4520.
- TATEMATSU H, KUROKAWA M, NIWA M, et al. Piscicidal constituents of *Stellera chamaejasme* L. II [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1984, 32 (4): 1612-1613.
- TIKHOMIROVA L I, MARKOVA L P, TUMBAA H. Coumarins from *Stellera chamaejasme* L. [J]. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 1984, (3): 402.
- YOSHIDA M, FENG W J, SAIJO N. Anti-tumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from *Stellera chamaejasme* [J]. International Journal of Cancer, 1996, 66 (2): 268-273.

# 生态补偿机制与生态系统服务功能评价

王淑军<sup>1</sup> 刘建<sup>2</sup> 王仁卿<sup>1,2\*</sup> 王玉涛<sup>1</sup>

(1 山东大学生命科学学院, 济南 250100; 2 山东大学环境研究院, 济南 250100)

## Ecological Compensation and Ecosystem Services Function Assessment

Wang Shu-jun<sup>1</sup> Liu Jian<sup>2</sup> Wang Ren-qing<sup>1,2\*</sup> Wang Yu-tao<sup>1</sup>

(1 School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China;

2 Institute of Environment Research, Shandong University, Jinan 250100, China)

**摘要** 生态补偿机制是对造成自然环境破坏的社会和经济行为进行处罚、对生态环境保护的行为实行奖励的制度,旨在寻求经济与环境以及人与自然的协调发展,是连接经济发展与生态环境保护的纽带,不但能为生态保护筹措资金,而且能统筹协调各行业的关系,促进产业更新,引导循环经济和清洁生产的发展,促进建设资源节约型社会。本文介绍了生态补偿的概念、经济学原理及补偿网络的构成,并针对当前生态补偿主要集中在理论和政策研究的情况,分析了在确定生态补偿的补偿依据和补偿额度方面所面临的问题,引进生态系统服务功能评价的原理与方法,探讨将生态系统服务功能评价应用于生态补偿的可行性。依据生态系统服务功能评价能够较为准确地反映出各个生态系统不同生态服务功能的价值,能为生态补偿的实施提供核算依据。本文最后讨论了将生态补偿机制与生态系统服务功能评价相结合在环境保护和提高自然资源利用率等方面的前景。

**关键词** 生态补偿; 生态系统服务功能; 补偿依据

**Abstract** Ecological compensation, which punishes the activities leading to environmental damage and encourages the organizations or individuals who contributes to the protection of environment, is an

基金项目: 山东省环境保护科技计划项目 (2006049), 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (2006BS08008), 山东省软科学研究计划 (A200527-1) 资助。

作者简介: 王淑军 (1982—), 男 (汉族), 山东人, 博士研究生, 主要从事环境生态学和生态经济学研究。

E-mail: shujunwang@mail.sdu.edu.cn

\* 通讯作者: wrq@sdu.edu.cn



effective way to deal with the problems caused by socio-economic development. Ecological compensation also plays an important role to achieve the coordinated and sustainable development of society, economy and environment and to develop the resources-saving and environment-friendly society. However, ecosystem is often too complex, socially contentious and full of uncertainties, and the values of many ecosystem services are neglected now. These factors have caused ecological compensation lacking of scientific bases to put into force. The concept of ecological compensation and its economic principle and structure were first illuminated. Then we analyzed the possibility to take ecosystem services function assessment as a way to cope with the valuation of different ecosystem services. The result found that the ecosystem services function assessment could act as compensation bases to promote the application of ecological compensation. The measures to combine the ecological compensation with ecosystem services function assessment to protect and improve the environmental quality and to promote the use efficiency of natural resources were discussed.

**Key words** compensation bases; ecological compensation; ecosystem services function assessment

## 1. 前言

从农业化社会、工业化社会一路走来,人类形成了自然资源零价值的惯性思维,认为自然资源是取之不尽用之不竭的,因此从未考虑过如何高效地利用资源 (Alexander *et al.*, 1998; Daily *et al.*, 2000; Batabyal *et al.*, 2003; Tallis and Kareiva, 2005)。但是在自然资源日渐稀少、环境破坏与日俱增的现实面前,人类不得不寻求提高资源利用效率、保护自然环境的有效途径,而解决这一问题的前提就是要打破资源零价值的思维定式,给环境赋值 (Costanza *et al.*, 1997; Alexander *et al.*, 1998; Daily *et al.*, 2000)。作为统筹兼顾环境保护与经济发展的体制,生态补偿机制 (ecological compensation) 将生态科学与经济学、环境科学相结合,为决策者提供环境保护方面的信息,使其在政策的制定过程中充分考虑该政策可能对环境造成的影响 (Costanza *et al.*, 1997; Buttoud, 2000; Daily *et al.*, 2000; Chee, 2004; Tallis and Kareiva, 2005), 成为解决上述环境问题的一种有效手段。

然而,目前生态补偿机制的研究主要停留在政策与理论层面,在生态补偿的参与者、补偿的资金来源及补偿方式的研究方面虽已有突破 (洪尚群, 2002; 毛显强等, 2002; 杜群, 2005; 邢丽, 2005; 曹明德, 2006; 杜群等, 2006; 王翠然等, 2006), 但是由于生态系统是极其复杂、彼此间紧密联系的 (Coatanza *et al.*, 1997; Daily *et al.*, 2000; De Groot *et al.*, 2002; Chee, 2004; Borchers, 2005; Winkler, 2006a), 因此生态补偿机制在环境的价值评价、生态补偿额度、补偿资金的使用等问题方面还普遍存在争议 (Winkler, 2006a; Winkler, 2006b), 导致生态补偿在补偿依据上缺乏数据支持,阻碍了生态补偿机制的广泛开展。

生态系统服务功能评价 (ecosystem services function assessment, ESFA) 为解决生态补偿的这一问题提供了方法与数据支持。ESFA 将经济学方法和生态学原理结合起来,在生态环境定价方面取得了一定的成果,能够较为详尽地计算出各个生态系统不同生态系统服务功能的价值,为人们更好地理解生态环境的价值提供了量化标准 (Costanza *et al.*, 1997; 张志强等, 2001; De Groot *et al.*, 2002), 可以为生态补偿提供较为实际可靠的数据依据。

本文在综述生态补偿理论的概念、经济学原理和补偿机制组成的基础上,分析了生态补偿尚存在的争议和问题,探讨了将生态系统服务功能评价的结果作为补偿量化依据在生态补偿中应用

的可行性。

## 2. 生态补偿理论

### 2.1 生态补偿的概念

生态补偿 (ecological compensation) 一词是荷兰政府于 1993 年在解决全国 15 条高速公路的选址问题时提出来的, Cuperus 等进一步完善了生态补偿的原理, 确定了施行生态补偿的原则就是要首先避免生态损失, 如果无法避免就要减少生态损失, 然后再对损失部分进行补偿, 即无净损失 (No-Net-Loss) 原则。在补偿的方式上, 首先考虑实物补偿或者提高其他具有相似功能生态区的生态质量的补偿方式, 其次才考虑以经济手段来进行补偿 (Cuperus *et al.*, 1996; Cuperus *et al.*, 1999; Cuperus *et al.*, 2001; Cuperus *et al.*, 2002)。目前国际上与我国生态补偿原理和目的相同的环境保护理论体系被称为生态服务付费体系 (Payment for Ecological Services System, PES), Pagliola (2002) 将 PES 定义为由于生态系统向社会公众提供了各种各样的环境服务, 该地方的拥有者或管理者、维护者向环境服务的消费者索取补偿, 以此来激励环境保护的一种机制。

关于生态补偿的定义国际上尚未统一。毛显强等将生态补偿定义为“通过对损害 (或保护) 资源环境的行为进行收费 (或补偿), 提高该行为的成本 (或收益), 从而激励损害 (或保护) 行为的主体减少 (或增加) 因其行为带来的外部不经济性 (或外部经济性), 达到保护资源的目的” (毛显强等, 2002); 杜群从法律角度将生态补偿定义为: 国家或社会主体之间约定对损害资源环境的行为, 要向资源环境开发利用主体进行收费或向保护资源环境的主体提供利益补偿性措施, 并将所征收的费用或补偿性措施的惠益通过约定的某种形式转达到因资源环境开发利用或保护资源环境而自身利益受到损害的主体, 以达到保护资源的目的的过程 (杜群, 2005)。

### 2.2 生态补偿的经济学原理

生态补偿理论结合了生态学、经济学、环境科学的系统知识, 以生态学和环境科学为理论指导和基础, 运用经济学的原理和方法, 解决生态环境的破坏问题, 已经成为目前国际社会上研究生态环境问题的一个主流。生态补偿主要涉及的经济理论包括以下内容。

#### 2.2.1 公共物品理论与外部效应理论

像自然资源这样具有非竞争性和非排他性特征的物品, 微观经济学中称其为公共物品 (Mankiw, 2004; 王丰年, 2006)。由于自然资源的公共物品的属性, 在微观经济主体对其使用的过程中, 无法体现其实际价值, 因而不能通过市场手段将其合理配置, 从而引起市场失灵, 继而引发自然资源消费的外部效应, 产生外部不经济效应, 即利益由资源使用者获得, 并导致自然资源减少、环境污染和生态失衡, 却由整个社会来承担其成本 (Mankiw, 2004; 王丰年, 2006)。

运用外部效应理论来解释环境恶化的原理是来源于庇古 (Pigou) 的思想。庇古在 1920 年出版的《福利经济学》一书中提出了通过对引起外部不经济性的活动征税以纠正外部不经济性的办法 (庇古, 1999), 即征收自然资源使用的“庇古税” (毛显强等, 2002; Mankiw, 2004; 王丰年, 2006)。

#### 2.2.2 产权理论

Coase 在 1960 年 The Problem of Social Cost 一文的发表, 提出环境问题不是由于市场缺陷而是由于环境资源产权的不明确所致的论断, 如果没有排他性产权安排, 必然会导致环境资源的过



度开发利用 (Coasr, 1960)。因此, 产权学派认为制止环境资源滥用、提高自然资源利用效率最有效的方法就是明确环境资源的产权, 建立起环境资源产权市场, 然后让市场来配置环境资源 (Coasr, 1960)。按照“科斯定理”, 只要交易成本为零, 不论产权界定给谁, 市场都会实现最优资源配置的效果 (毛显强等, 2002; Mankiw, 2004)。产权理论并不是对外部性理论的替代, 而是进一步丰富了经济学家对环境问题的解释。

在庇古税和科斯定理的指导下, 环境经济学家提出了以直接管制、征税、排污权交易等各种途径来解决环境问题的政策。

2.3 生态补偿机制的组成

建立生态系统服务付费市场机制受很多因素影响 (图 1)。按照生态补偿的来源、过程、接受者的不同, 生态补偿机制可分为补偿主体、补偿客体、补偿方式三个组成部分。

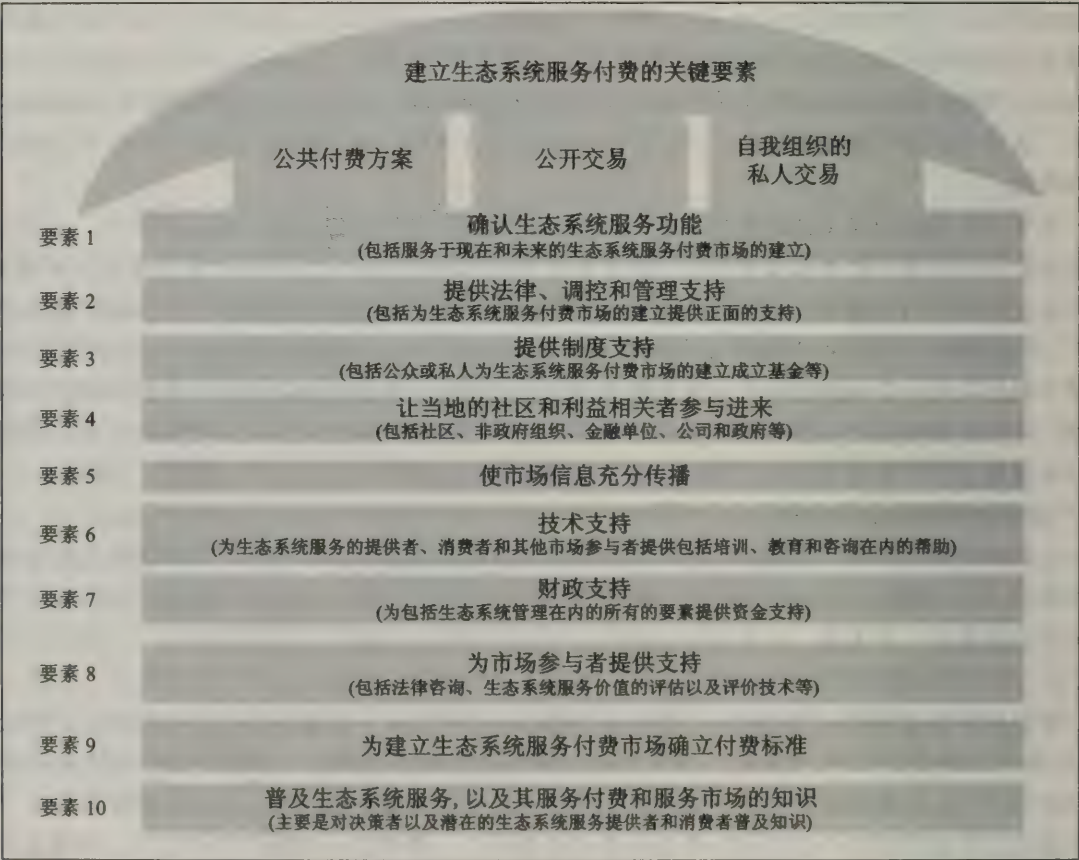


图 1 建立生态系统服务付费市场机制的关键因素 (Scherr et al., 2006)

Fig. 1 Essential components for establishing ecosystem services payments and markets (Scherr et al., 2006)

2.3.1 补偿主体

生态补偿的补偿主体是指在自然资源的开发利用过程中, 由于产生了环境污染、景观破坏、生态失衡、生物多样性降低等外部不经济性, 从而需要承担一定责任、提供补偿资源的组织或个人, 如果主体不明确, 则由政府来承担弥补损失的责任。

各级政府通过制定优惠政策, 下放部分权利, 从政府财政提供资金等形式, 以及向损害环境和消费自然资源的企业 (如化工厂、石灰厂、水泥厂、造纸厂等)、组织、个人等收缴生态环境

保护税费,为生态补偿提供支持;金融机构通过向补偿客体提供优惠贷款,或者向补偿地区直接投资,以促进受偿地区的经济发展,修复遭受破坏的环境,并有足够的资金进一步保护和加强环境建设;民间组织和环保社团通过宣传生态保护意识提高民众对保护生态环境的重要性的认识,普及环保知识,在此基础上呼吁民众以自觉捐款等形式为生态保护和生态补偿筹集人力资源、物力资源以及生态补偿资金;国际组织如联合国环境署、世界银行、边界银行、亚洲银行等官方国际组织和世界野生动物保护基金会等民间国际组织,可以直接对受补偿地区或群体进行补偿,也可通过政府补偿机构或民间补偿组织,进行间接补偿(洪尚群等,2002;杜群,2005)。

### 2.3.2 补偿客体

生态补偿的补偿客体是指遭受自然资源破坏、消耗的地区,或因自然环境破坏而导致其生存状况或生活水平等下降的组织或个人,或者在保护自然环境、促进环境发展等方面做出贡献的组织或个人。

补偿客体是多样化的,所有致力于环境保护的地方政府、组织、社团、个人以及生态环境遭到破坏地区的政府、个人等都可作为生态补偿的客体,接受来自于补偿主体的补偿(杜群,2005;杜群等,2006)。

### 2.3.3 补偿方式

生态补偿的补偿方式是指补偿主体对补偿受体提供生态补偿所运用的手段、方法和过程。目前国内外最常用的补偿方式是资金补偿(financial compensation),这也是最迫切急需的补偿方式(洪尚群等,2002)。即将生态补偿主体提供的财政转移资金、生态补偿税费等用于雇用相应的人力资源以及购买环境保护所需要的工具、仪器等,为环境保护组织或个人支付酬金,以此为减少环境破坏、提高环保意识、促进环境发展等提供财政基础(洪尚群等,2002;邢丽,2005)。资金补偿的主要来源包括生态补偿备用金、生态补偿税费、政府补偿、优惠贷款、生态补偿基金、生态彩票、国外贷款和异地生态补偿基金等(毛显强等,2002;洪尚群等,2002;邢丽,2005;曹明德,2006)。

补偿主体也可通过向补偿受体地区提供环境保护所需的基本物质资料(如生产工具、环保仪器等)、人力资源和土地资源等(Cuperus *et al.*, 2001),作为物质补偿(goods compensation)手段,解决补偿客体部分的生产要素和生活要素,改善补偿地区或群体的生活状况,增强生产能力(Cuperus *et al.*, 2001;洪尚群等,2002);为环保组织或个人提供宣传资料、宣传工具等,增强其环境保护的信念,激励其继续深入开展环保活动。

作为环境保护的主导者,上级政府通过适当的权力下放,向补偿受体地区提供政策补偿(policy compensation),赋予基层政府具有能够更为主动灵活地制定各种优惠政策等方面的权力,使受补偿地区依靠这些优惠政策能够有效地促进环境的保护与发展,并为筹集环境保护所需要的人力资源、资金资源等提供方便(洪尚群等,2002;王翠然等,2006)。对于环境破坏严重、经济相对落后的地区来说,上级政府能够给予充分的政策补偿是十分重要的,这直接关系到环保资金的筹集与有效使用等方面的问题(洪尚群等,2002)。

补偿主体通过开展技术(techniques)和教育(education)服务,作为一种补偿手段向受补偿地区或群体普及环保知识、宣传环保意识,使资源使用者和环境破坏者充分认识到自然环境的重要性,并向受补偿地区或群体输送各类专业人才,提供无偿技术咨询和指导,培养(训)受补偿地区或群体的技术人才和管理人才,提高补偿客体的生产技能、技术含量、环保常识、环保动力和管理组织水平(Cuperus *et al.*, 1996; Cuperus *et al.*, 1999; Cuperus *et al.*, 2001;洪尚群等,2002;杜群,2005)。



尽管现在在补偿方式上以资金补偿为主,但是 Cuperus 等认为真正以环境保护为目标的生态补偿应该首先是进行实物补偿,或者是通过加强与环境破坏地区生态功能相似的地区的生态质量来补偿因遭破坏地区环境质量下降而导致的整体生态功能衰退,其次才考虑以经济手段来进行补偿 (Cuperus *et al.*, 1996; Cuperus *et al.*, 1999; Cuperus *et al.*, 2001; Cuperus *et al.*, 2002)。随着人类环保意识的逐渐增强,环境保护的政策与机制的不断健全,最终将会实现以实物补偿为主,资金补偿为辅的环境友好型 (environmental-friendly) 补偿机制。

生态补偿机制详细研究各个补偿主体所应提供生态补偿的方式、额度以及确定对环境破坏者所需支付的费用额度,并在补偿客体富于变化的情况下,针对不同的客体来选择恰当的补偿主体、补偿方式以及补偿的额度等,以形成一套可针对不同环境破坏情况和生态补偿需求的生态补偿网络体系 (图 2)。

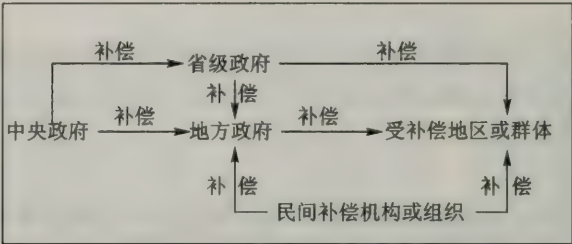


图 2 生态补偿网络的构成 (洪尚群, 2002)

Fig. 2 Framework of ecological compensation web

3. 生态补偿依据的选择

3.1 生态补偿依据存在争议

国内生态补偿的研究开展得比较晚,多是参考国外的研究 (张文心等, 2003; 栗晏和赖庆奎, 2005; 王翠然等, 2005), 在生态补偿机制方面大多数还停留在政策理论的研究上 (毛显强, 2002; 洪尚群等, 2002; 邢丽, 2005; 杜群, 2005; 王丰年, 2006; 王金南等, 2006), 由于生态系统是极其复杂、彼此间紧密联系的 (Coatanza *et al.*, 1997; Daily *et al.*, 2000; De Groot *et al.*, 2002; Chee, 2004; Borchers, 2005; Winkler, 2006a), 因此在环境的定价问题、资金的使用问题等方面环境经济学家和生态学家还存在很大的争议 (Winkler, 2006a; Winkler, 2006b), 导致生态补偿在补偿依据上缺乏数据支持, 阻碍了生态补偿机制的广泛开展。

环境经济学家认为, 环境治理的目标并不是环境质量越高越好, 因为随着环境质量的逐步改善, 进一步改善环境的边际成本会越来越高, 而相应的环境改善所带来的边际效益则会越来越小, 因此, 从经济效益的角度来分析, 最优环境质量目标应是在环境治理的边际成本与边际收益相等的水平上, 即以最小的成本来实现既定环境目标 (Mankiw, 2004)。生态学家则认为, 生态环境是人类存在与发展的基础 (王金南等, 2006), 任何行为都要将环境保护作为首要任务, 任何对环境遭受破坏的行为都要禁止, 即生态环境具有“一票否决权”。

由于生态环境的一些潜在价值无法在当前的市场价值体系中得到体现, 目前国内外在补偿方式上主要以经济补偿为主 (王成, 2005), 其他方式作为辅助, 补偿方式过于单一。在经济补偿的额度上还存在很大的争议, 经济学的方法强调以人为中心, 注重于环境的使用价值或经济价值, 而生态学的方法则以生态环境为中心, 难以将人类对社会经济的需求考虑在内 (Winkler,

2006a; Winkler, 2006b)。而经济补偿的方法过多地依赖于经济学理论, 缺乏对生态系统自身规律的分析, 没有形成较为系统的评价方法 (Costanza *et al.*, 1997)。

生态系统服务功能评价 (Ecosystem Service Function Assessment, ESFA) 利用基于市场 (market-based) 的评价技术体系、替代市场 (surrogate market) 技术体系和模拟市场 (simulated market) 技术体系 (Chee, 2004), 将不同的生态环境和生态类型的非市场价值以货币化形式表现出来。生态系统服务功能评价的研究目前主要集中于评价方法的选择优化、评价数值的精确化以及对宏观和区域生态系统方面的生态系统服务评价 (Bolund and Hunhammar, 1999; Loomis *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Hoehn *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Gürlük, 2006), 然而所获得的功能价值并未在实际中得到广泛应用。

### 3.2 生态系统服务功能评价作为生态补偿的补偿依据

#### 3.2.1 生态系统服务功能评价概述

尽管生态系统服务 (ecosystem service) 一词于 1970 年被 Study of Critical Environmental Problems (SCEP) 首次使用, 但真正掀起对生态系统服务功能研究的高潮是 Costanza 在 *Nature* 上发表的 *The value of the world's ecosystem services and nature capital* 一文之后。Costanza 等和 De Groot 等将生态系统服务功能定义为生态系统与生态过程以直接或间接的形式向人类提供各种生态服务和生态产品, 并维持人类赖以生存的自然环境条件与效用, 使人类直接或间接从生态系统得到利益 (De Groot, 2002; Costanza *et al.*, 1997)。

由于生态系统服务的价值不能在市场经济体系中得以体现或者是仅有部分价值能够通过资本市场被反映出来, 从而导致了生态环境的大部分服务价值由于没有被人类所认识而被低估甚至是被忽略 (Alexander *et al.*, 1998; Daily *et al.*, 2000; Batabyal *et al.*, 2003; Tallis and Kareiva, 2005)。

要解决生态系统服务功能的定价问题, 首先需要对这些功能进行分类。Costanza 等将全球 16 个生态系统 (海洋、森林、湿地、湖泊河流、沙漠等) 所提供的生态系统服务分为 17 种 (气体调节、气候调节、涵养水源、原材料供应等) (Costanza *et al.*, 1997)。之后 De Groot 等在 Costanza 的基础上, 将生态系统服务分为调节功能、栖息地提供功能、产品提供功能和信息功能四大类, 并进一步细分为 23 个小类 (De Groot *et al.*, 2002)。Daily 等将生态系统服务分为物质生产功能、再生功能、稳定功能、生命支撑功能和选择价值等五类 (Daily, 1999)。在国内, 戴星翼等将生态系统服务分为调节功能、文化功能和支持功能三类, 17 个小类 (戴星翼等, 2005)。总体来说, 目前国内外在生态服务类型划分上已经基本统一。

基于经济学理论的计算方法在评价生态系统服务价值中应用较广。De Groot 等将评价生态系统服务的方法分为直接市场评价法、间接市场评价法、条件价值法和集体估价法, 其中间接市场评价法包含了防护费用法、替代成本法、生产要素收入法、旅行成本法和享乐价格法等, 并介绍了这些方法的原理, 进一步分析了评价不同生态服务类型的首选方法及备用方法 (De Groot *et al.*, 2002)。Chee 根据新古典经济学理论, 将评价生态系统服务技术分为基于市场 (market-based, MB) 的评价技术、替代市场 (surrogate market, SuM) 评价技术和模拟市场 (simulated market, SiM) 评价技术三类, 并对常用的产品功能分析法 (production function analysis, PF)、恢复费用法 (restoration cost)、替代成本法 (replacement cost)、旅行费用法 (travel cost method, TCM)、享乐价值法 (hedonic pricing, HP) 和条件价值法 (contingent valuation method, CVM) 等的优缺点作了分析 (Chee, 2004)。Winkler 针对目前评价方法多偏爱经济学理论的情况, 提出了一种同时平衡社会、生态系统和经济系统的整合动态的评价方法 (Winkler, 2006a;



Winkler, 2006b)。国外学者在生态系统服务的评价方法上做了大量的研究 (Costanza *et al.*, 1999; Costanza *et al.*, 1998; Borjesson *et al.*, 2000; Sutton and Costanza, 2002; Boumans *et al.*, 2002; Winkler, 2006a; Winkler, 2006b)。国内张志强等和戴星翼等也对评价方法作了详细介绍 (张志强等, 2001; 张志强等, 2003; 戴星翼等, 2005)。

生态系统服务功能理论在应用方面还主要集中于计算宏观生态系统的服务价值。继 Costanza 等计算了全球的生态系统服务价值之后 (Costanza *et al.*, 1997), 国外对森林、湿地等具有重要生态功能的生态系统展开了评价 (Bolund and Hunhammar, 1999; Loomis *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Kreuter *et al.*, 2001; Woodward and Wui, 2001; Hoehn *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Sayer *et al.*, 2004; Taft and Haig, 2005; Gürlük, 2006; Matero and Saastamoinen, 2007)。在国内, 欧阳志云等首次运用生态系统服务功能原理计算了中国陆地生态系统的服务价值 (欧阳志云等, 1999), 但是国内大部分研究都借鉴了 Costanza 等的生态功能分类体系 (Costanza *et al.*, 1997), 并结合中国的数据计算不同地区或不同生态类型的生态系统服务功能价值 (Shi, 2002; 辛琨等, 2002; 徐中民等, 2003; Xu *et al.*, 2003; 鲁春霞等, 2004; 侯元兆等, 2005; 王伟等, 2005; 胡艳琳等, 2005; 张天华等, 2005; 靳芳等, 2005; 段晓峰等, 2006; Tong *et al.*, 2007), 还有研究者直接将 Costanza 的数据引用过来 (张乃莉等, 2004), 并没有从效用理论的角度出发, 结合中国的环境价值标准, 发展出一套适用于中国生态环境定价的体系, 也未能将得到的数据应用于中国的环境保护政策之中。

### 3.2.2 生态系统服务功能评价在生态补偿中的应用

生态系统服务功能评价将经济学方法和生态学原理结合起来, 把生态系统分类后计算出各个生态系统服务功能的价值, 尽管由于生态系统的复杂性, 得出的结果并不是非常准确, 但是在一定程度上反映了不同生态系统的价值 (Costanza *et al.*, 1997), 为遭破坏或受保护地区实行生态补偿提供了数据依据, 解决了生态补偿面临的征收多少、补偿多少等关键性问题 (图 3)。

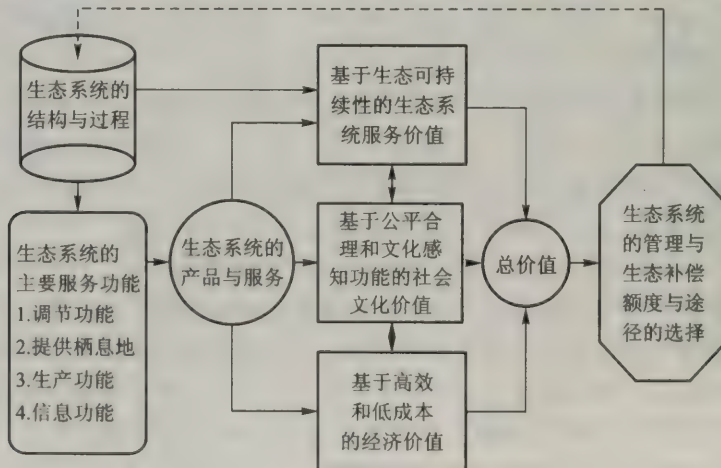


图 3 生态系统服务评价为生态补偿提供补偿依据 (De Groot *et al.*, 2002)

Fig. 3 Ecological compensation based on ecosystem services assessment

在微观水平上, 生态系统服务功能评价可以计算出某个生态系统 (如森林) 的单一生态功能 (如净化空气) 在单位面积上每年所创造的价值, 进而计算出各个生态系统不同生态服务功能的总价值 (Costanza *et al.*, 1997)。在此基础上, 可以提供关于不同生态系统结构和功能的信息, 提供生态系统在支持人类福祉方面所起的多样和复杂作用的信息。对生态系统服务功能的边

际效益的评价可以计算出每一单位自然资源的消耗或每一单位生态环境破坏所造成的社会成本，提供了关于自然环境相对稀缺性以及质量问题的信息，可以为自然资源保育或恢复政策的制定提供价值参考，防止自然资源的误用或滥用，为实现微观范围内的生态补偿提供了较为可靠的数字依据（Howarth and Farber, 2002；Chee, 2004；杨光梅等, 2006），并可作为指导人类正确利用生态系统的依据。

举例来说，在采石场的选址的问题中，通过生态系统服务功能评价理论体系可以计算出采石场对拟开采地区所造成生态环境的损失价值（表 1），再由政府主导，企业以资金补偿的方式向受影响地区的基层政府或群众缴纳相应价值的资金，或者以实物补偿的方式由政府指定一块具备与开采地区各种参数相类似的宜林荒山荒地，让企业在规定时间内对其进行植被恢复，并由政府和当地群众组织验收。但是由于当地景观等遭到破坏，企业必须向被开采地区的群众缴纳相应的补偿费用，因此各种补偿方式应该根据具体生态补偿的要求互相组合、互为补充，提高补偿效率。

表 1 采石场拟选址地区所提供的部分生态功能及可选用的评价方法  
Table1 Ecosystem services in quarry area and assessment methods

生态系统服务功能	评价技术	举例
大气调节	SuM <sup>a</sup>	植被吸收 CO <sub>2</sub> 、SO <sub>2</sub> 和粉尘，释放 O <sub>2</sub>
局部气候影响	SuM	植被有降低局部气温的功能
减少泥石流	SuM/MB <sup>b</sup>	植被根系和土壤相互作用，可以防止泥石流的发生
涵养水源	SuM	有林地土壤的含水量大于无林地
土壤形成	SuM	植物的枯枝落叶等可在土壤中微生物等的作用下分解并缓慢形成土壤
提供产品	MB	水果等
提供原材料	MB	木材、牧草
景观娱乐功能	SiM <sup>c</sup>	提供休闲娱乐的场所
营养循环	SuM	植被吸收 CO <sub>2</sub> 、SO <sub>2</sub> ，固定 N 等到植物体中，植物体在被利用的过程中实现了营养的循环
传粉	SuM	昆虫具有为植物传粉的功能
生物多样性/生物栖息地	SuM/MB	原生物群落的生物多样性在开采后难以维持

注：a. 替代市场（surrogate market, SuM）评价技术，b. 基于市场（market-based, MB）的评价技术，c. 模拟市场（simulated market, SiM）评价技术。

生态系统服务功能评价理论体系在生态补偿的微观层次上有着广泛的应用前景，可以为由于煤矿区塌陷、城市向周边地区的扩张、公路建设等对环境有负面影响的活动实行惩罚性生态补偿提供补偿依据，同样也可以为植树造林、绿化荒山等保护生态环境的行为实行奖励性生态补偿提供补偿依据。

在宏观水平上，生态系统服务功能价值评价有助于制定人类福利和可持续发展的生态补偿的指标体系，计算出大尺度上或不同区域的各生态系统的的服务价值，为实现区域间（如省际之间、市际之间）或流域间（如河流的上下游）生态补偿提供了较为合理可靠的数字依据（Coase, 1960；杨光梅等, 2006）。



比如,在大江大河的上游植树造林,提高植被覆盖率可以有效地涵养水源,缓解降水高峰期的水流量,减少洪水暴发的概率,也能起到净化水源的作用,为下游地区提供洁净稳定的水源,使下游地区的经济发展得到保障,但是也禁锢了上游地区的经济发展。因此,在宏观的范围内下游地区受惠于上游的环境保护,应该对上游地区进行生态补偿,使上游的政府和群众得到合理的资金或物质补偿,并以此来激励其环境保护的积极性。通过生态系统服务功能评价理论体系可以计算出上游的政府和群众在环境保护中所产生的价值,为其接受相应的资金或物质等的补偿提供补偿依据,也可以计算出下游地区由于上游的环境保护而间接得到的收益,为下游地区向上游地区提供补偿的形式及数量提供补偿依据。

由此可见,生态系统服务功能价值评价的目的不是单纯地为了给环境或其组成部分赋予价格,而是为了体现生态系统服务的边际变化对人类产生的影响(Howarth and Farber, 2002; 杨光梅等, 2006; Coase, 1960),其最终目的应该是在生态环境保护的国际大环境下得到广泛的实际应用,为生态补偿提供理论与数据支持,促进生态补偿深入广泛的开展。

## 4. 展望

### 4.1 生态补偿是与生态环境保护密切相关的一种经济手段

建立生态补偿机制就是要实现生态环境外部性的内部化,解决好生态资源这一特殊公共产品在消费中的合理价值定位,改变传统的无偿使用生态资源的习惯,让生态自然资源的使用者支付相应的费用,并维护好生态投资者的合理回报,激励人们从事生态保护投资并使生态资本增值,促使区域在制定经济发展规划的同时充分考虑对资源环境破坏造成的社会成本,从源头上促进经济社会与资源环境的协调发展,有助于使外部补偿转化为自我发展能力的积累和提高,从而加快结构调整,改善环境质量,转变增长方式,利用经济和行政激励手段,协调各方利益,激发全区域、全社会促进生态保护和经济社会协调发展的创造活力,逐步缩小经济社会发展中的地区差别、城乡差别,促进重要生态功能区在保持生态环境稳定的前提下,实现经济社会的跨越式发展,共同走向生态环境良好、人民生活富裕的道路(王丰年, 2006)。

### 4.2 生态系统服务功能评价是实现生态环境资源价值货币化的首选手段

在自然资源日益稀少、环境破坏却愈演愈烈的背景下,生态系统服务功能评价成功地将经济学方法和生态学原理结合起来,利用生态科学、环境科学作为理论依据,以经济学方法为手段,以解决自然资源的外部性问题为目的,对微观或宏观的不同生态类型所提供的不同生态系统服务功能做出定价,并以货币化的形式表现出来,彻底推翻了传统上所认为的环境资源零价值的谬论(Costanza *et al.*, 1997; Alexander *et al.*, 1998; Cuperus *et al.*, 1996; 马国青等, 2002),使人们对环境的价值有了更为直观的理解,有利于人们在经济活动后更好地考虑经济活动的环境成本,实现可持续发展。

### 4.3 生态系统服务功能评价在生态补偿机制等环境保护政策中的应用

将生态系统服务功能评价所得出的数据作为生态补偿的补偿依据,弥补了目前生态补偿机制在补偿依据上的缺陷,也使生态系统服务功能评价在实际中得到了应用。在国家制定的天然林保护工程、退耕还林、退耕还湿、退耕还草、绿色 GDP 核算等环境保护政策以及环境影响评价(environmental impact assessment, EIA)、战略环境评价(strategic environment assessment, SEA)、城市规划等环境评价技术中(张凯等, 2005),也需要对所涉及的生态系统的不同生态功能做出符合中国实际的定价,这使得生态系统服务功能评价可以在环境保护的众多领域具有很高的应用

价值,能够促进各项环境保护政策更为有效、快速、深入的实施,加快我国在环境保护工作中的步伐。

#### 4.4 深入研究生态补偿机制和生态系统服务功能评价的实际应用价值

目前生态补偿理论研究还大多停留在理论层面,在补偿主体、补偿客体、补偿依据以及补偿的额度等方面还有待于进一步深入研究,但是没有补偿的客观依据、没有与实践相结合的生态补偿理论也是没有意义的、无法施行的。而生态系统服务功能评价目前太专注于计算方法的优化以及计算结果的精确性方面,与实际应用还存在一定的距离。然而由于生态系统本身的复杂性、多变性 (Chee, 2004),生态系统服务功能计算的结果不可能非常精确,生态系统服务功能计算只有运用到实践中去,为生态补偿、天然林保护工程、退耕还林、退耕还湿、退耕还草、绿色GDP核算等环境保护政策提供补偿依据、价值参考才是有实际意义的。在以后的研究中,要将重点放在价值评价在生态补偿等环保政策、方法中的应用方面,即如何才能较为实际地体现出生态环境的真正价值,并结合中国和地方的实际情况,为环境保护政策提供正确的、系统的、有参考价值的指导依据,最终形成一套切合实际的具有普遍应用性的“评价-补偿”体系。

### 参考文献

- 庇古. 福利经济学 [M]. 北京: 中国社会科学出版社, 1999.
- 曹明德. 试论建立我国生态补偿制度 [G] // 庄国泰, 王金南. 生态补偿机制与政策设计国际研讨会论文集. 北京: 中国环境科学出版社, 2006, 40-48.
- 戴星翼, 俞厚未, 董梅. 生态服务的价值实现 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- 杜群. 生态补偿的法律关系及其发展现状和问题 [J]. 现代法学, 2005, 3: 186-191.
- 杜群, 张萌. 我国生态补偿法律政策现状和问题 [G] // 庄国泰, 王金南. 生态补偿机制与政策设计国际研讨会论文集. 北京: 中国环境科学出版社, 2006, 61-70.
- 段晓峰, 许学工. 区域森林生态系统服务功能评价 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 网络版, 2006, 2: 1-6.
- 洪尚群, 吴晓青, 陀正阳, 等. 补偿途径和方式多样化是生态补偿基础和保障 [J]. 环境科学与技术, 2002, 14 (24): 40-42.
- 侯元兆, 吴水荣. 森林生态服务价值评价与补偿研究综述 [J]. 世界林业研究, 2005, 3: 1-5.
- 胡艳琳, 戚仁海, 由文辉, 等. 城市森林生态系统生态服务功能的评价 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 3: 111-114.
- 靳芳, 鲁绍伟, 余新晓, 等. 中国森林生态系统服务功能及其价值评价 [J]. 应用生态学报, 2005, 16 (8): 1531-1536.
- 鲁春霞, 谢高地, 肖玉, 等. 青藏高原生态系统服务功能的价值评估 [J]. 生态学报, 2004, 12: 2749-2755.
- 马国青, 宋春姬. 森林效益评价与公益林生态补偿问题的思考 [J]. 防护林科技, 2002, 1: 41-44.
- 毛显强, 钟瑜, 张胜. 生态补偿的理论探讨 [J]. 中国人口·资源与环境, 2002, 12 (4): 38-41.
- 欧阳志云, 王效科, 苗鸿. 中国陆地生态系统服务功能及其生态经济价值的初步研究 [J]. 生态学报, 1999, 5: 607-613.
- 粟晏, 赖庆奎. 国外社区参与生态补偿的实践及经验 [J]. 林业与社会, 2005, 4: 40-44.
- 王成. 浅议生态补偿方式 [J]. 污染防治技术, 2005, 1: 36-37.
- 王翠然, 陆根法, 蔡邦成. 中国道路建设生态补偿机制建立的理论思考 [J]. 环境保护科学, 2006, 3: 43-45.
- 王丰年. 论生态补偿的原则和机制 [J]. 自然辩证法研究, 2006, 22 (1): 31-35.
- 王金南, 万军, 张惠远, 等. 中国生态补偿政策评估与框架初探 [G] // 庄国泰, 王金南. 生态补偿机制与政策设计国际研讨会论文集. 北京: 中国环境科学出版社, 2006, 13-24.

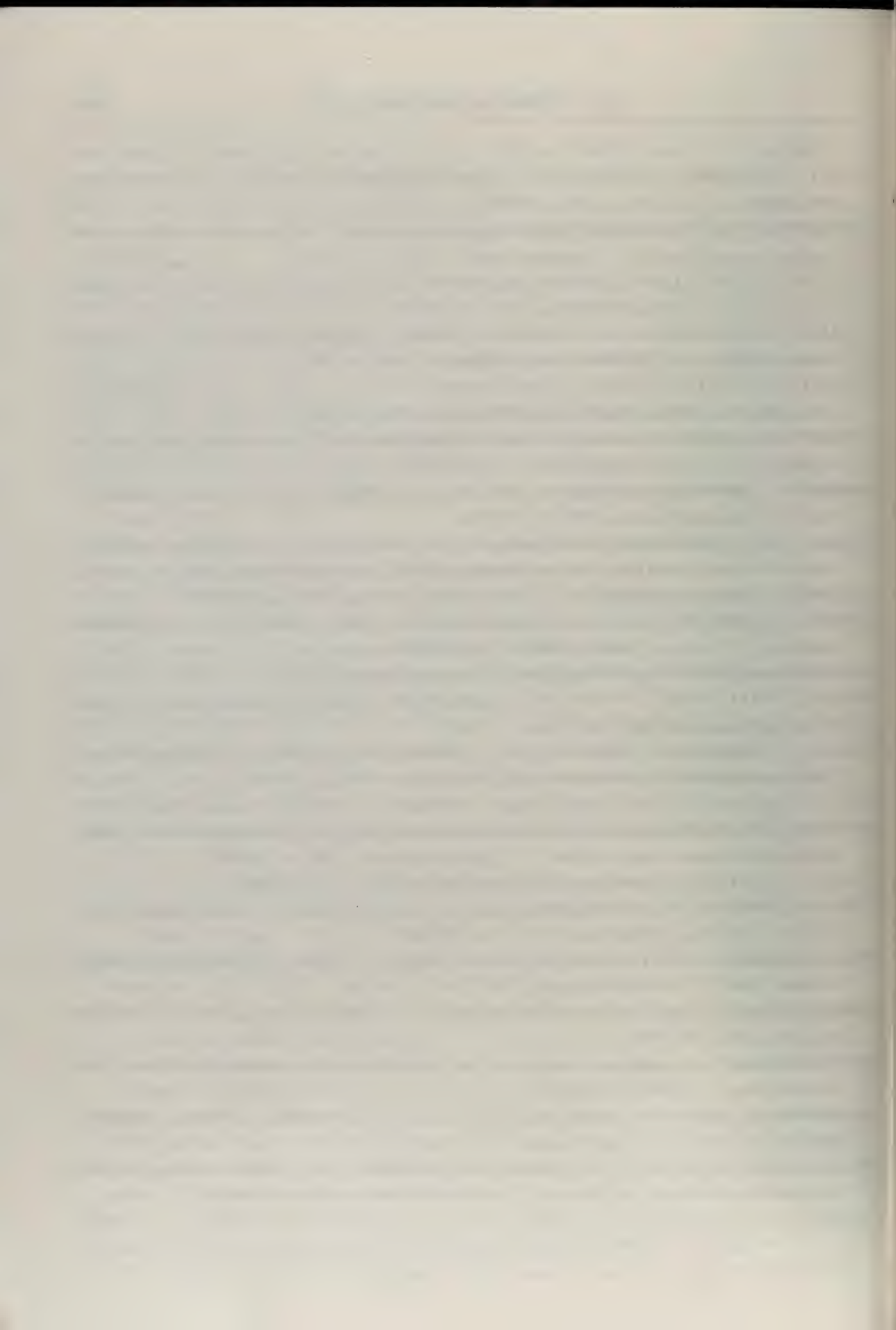


- 王伟, 陆健健. 三垌湿地生态系统服务功能及其价值 [J]. 生态学报, 2005, 3: 404-407.
- 辛琨, 肖笃宁. 盘锦地区湿地生态系统服务功能价值估算 [J]. 生态学报, 2002, 8: 1345-1349.
- 邢丽. 关于建立中国生态补偿机制的财政对策研究 [J]. 财政研究, 2005, 1: 20-22.
- 徐中民, 张志强, 龙爱华, 等. 额济纳旗生态系统服务恢复价值评估方法的比较与应用 [J]. 生态学报, 2003, 9: 1841-1850.
- 杨光梅, 李文华, 闵庆文. 生态系统服务价值评估研究进展 [J]. 生态学报, 2006, 1: 205-212.
- 张凯, 任丽军. 山东省战略环境评价方法与应用研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- 张乃莉, 王妮, 郭继勋. 吉林省生态系统服务价值评估 [J]. 生态科学, 2004, 23 (3): 270-272.
- 张天华, 陈利顶, 普布丹巴, 等. 西藏拉萨拉鲁湿地生态系统服务功能价值估算 [J]. 生态学报, 2005, 12: 3176-3180.
- 张文心, 陈吕军, 赵华林, 等. 美国补偿环境项目的设计与实施 [J]. 环境保护, 2003, 5: 62-64.
- 张志强, 徐中民, 程国栋. 生态系统服务与自然资本价值评估 [J]. 生态学报, 2001, 11: 1918-1926.
- 张志强, 徐中民, 程国栋. 条件价值评估法的发展与应用 [J]. 地球科学进展, 2003, 18 (3): 454-463.
- ALEXANDER A M, LIST J A, MARGOLIS M, et al. A method for valuing global ecosystem services [J]. *Ecological Economics*, 1998, 27: 161-170.
- BATABYAL A A, KAHN J R, O'NEILL R V. On the scarcity value of ecosystem services [J]. *Journal of Environmental Economics and Management*, 2003, 46: 334-352.
- BOLUND P, HUNHAMMAR S. Ecosystem services in urban areas [J]. *Ecological Economics*, 1999, 29: 293-301.
- BORCHERS J G. Accepting uncertainty, assessing risk: Decision quality in managing wildfire, forest resource values, and new technology [J]. *Forest Ecology and Management*, 2005, 211: 36-46.
- BORJESSON P. Economic valuation of the environmental impact of logging residue recovery and nutrient compensation [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2000, 19: 137-152.
- BOUMANS R, COSTANZA R, FARLEY J, et al. Modeling the dynamics of the integrated earth system and the value of global ecosystem services using the GUMBO model [J]. *Ecological Economics*, 2002, 41: 529-560.
- BUTTOUD G. How can policy take into consideration the "full value" of forests? [J] *Land Use Policy*, 2000, 17: 169-175.
- CHEE Y E. An ecological perspective on the valuation of ecosystem services [J]. *Biological Conservation*, 2004, 120: 549-565.
- COASR R H. The problem of social cost [J]. *Journal of Law and Economics*, 1960, 3: 6-17.
- COSTANZA R, ANDRADE F, ANTUNES P, et al. Ecological economics and sustainable governance of the oceans [J]. *Ecological Economics*, 1999, 31: 171-187.
- COSTANZA R, D'ARCE R, DE GROOT R, et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital [J]. *Nature*, 1997, 387: 253-260.
- COSTANZA R, D'ARCE R, DE GROOT R, et al. The value of ecosystem services: putting the issues in perspective [J]. *Ecological Economics*, 1998, 25: 67-72.
- CUPERUS R, BAKERMANS M M, UDO DE HAES H A, et al. Ecological compensation in Dutch Highway [J]. *Environmental Management*, 2001, 27 (1): 75-89.
- CUPERUS R, CANTERS K J, PIEPERS A G. Ecological compensation of the impacts of a road-preliminary method for the A50 road link (Eindhoven-Oss, The Netherlands) [J]. *Ecological Engineering*, 1996, 7 (4): 327-349.
- CUPERUS R, CANTERS K J, UDO DE HAES H A, et al. Guidelines for ecological compensation associated with highways [J]. *Biological Conservation*, 1999, 90 (1): 41-51.
- CUPERUS R, KALSBECK M, UDO DE HAES, H A, et al. Preparation and implementation of seven ecological compensation plans for Dutch Highways [J]. *Environmental Management*, 2002, 29 (6): 736-749.
- DAILY G C. Developing a scientific basis for managing earth's life support systems [J]. *Conservation Ecology*, 1999,

3 (2):14.

- DAILY G C, SÖDERQVIST T, ANIYAR S, et al. The value of nature and the nature of value [J]. *Science*, 2000, 289: 395-396.
- DE GROOT R, WILSON M A, BOUMANS R. A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services [J]. *Ecological Economics*, 2002, 41: 393-408.
- GUO Z W, XIAI X M, GAN Y L, et al. Ecosystem functions, services and their values-a case study in Xingshan County of China [J]. *Ecological Economics*, 2001, 38: 141-154.
- GÜRLÜK S. The estimation of ecosystem services' value in the region of Misi Rural Development Project: results from a contingent valuation survey [J]. *Forest Policy and Economics*, 2006, 9: 209-218.
- HOEHN J P, LUPI F, KAPLOWITZ M D. Untying a Lancasterian bundle: valuing ecosystems and ecosystem services for wetland mitigation [J]. *Journal of Environmental Management*, 2003, 68: 263-272.
- HOWARTH R B, FARBER S. Accounting for the value of ecosystem services [J]. *Ecological Economics*, 2002, 41: 421-429.
- KREUTER U P, HARRIS H G, MATLOCK M D, et al. Change in ecosystem service values in the San Antonio area, Texas [J]. *Ecological Economics*, 2001, 39: 333-346.
- LOOMIS J, KENT P, STRANGE L, et al. Measuring the total economic value of restoring ecosystem services in an impaired river basin: results from a contingent valuation survey [J]. *Ecological Economics*, 2000, 33: 103-117.
- MANKIW N G. Principles of economics [M]. 3rd edition. Thomson Learning, 2004, pp: 205-220.
- MATERO J, SAASTAMOINEN O. In search of marginal environmental valuations-ecosystem services in Finnish forest accounting [J]. *Ecological Economics*, 2007, 61 (1): 101-114.
- PAFIOLA S. Paying for Water Services in Central America: Learning from Costa Rica, 2002, pp: 37-61.
- SAYER J, CHOKKALINGAM U, POULSEN J. The restoration of forest biodiversity and ecological values [J]. *Forest Ecology and Management*, 2004, 201: 3-11.
- SCHERR S J, BENNETT M T, LOUGHNEY M, et al. Developing Future Ecosystem Service Payments in China: Lessons Learned from International Experience [M]. *Forest Trends*, 2006, pp: 12-44.
- SHI T. Ecological economics in China: origins, dilemmas and prospects [J]. *Ecological Economics*, 2002, 4: 15-20.
- SUTTON P, COSTANZA R. Global estimates of market and non-market values derived from nighttime satellite imagery, land cover, and ecosystem service valuation [J]. *Ecological Economics*, 2002, 41: 509-527.
- TALLIS H, KAREIVA P. Ecosystem services [J]. *Current Biology*, 2005, 15: R746-R748.
- TAFT O W, HAIG S M. The value of agricultural wetlands as invertebrate resources for wintering shorebirds [J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2005, 110: 249-256.
- TONG C F, FEAGIN R A, LU J J, et al. Ecosystem service values and restoration in the urban Sanyang wetland of Wenzhou, China [J]. *Ecological Engineering*, 2007, 29 (3): 249-258.
- WINKER R. Valuation of ecosystem goods and services Part 1: an integrated dynamic approach [J]. *Ecological Economics*, 2006a, 59: 82-93.
- WINKER R. Valuation of ecosystem goods and services Part 2: implications of unpredictable novel change [J]. *Ecological Economics*, 2006b, 59: 94-105.
- WOODWARD R T, WUI Y S. The economic value of wetland services: a meta-analysis [J]. *Ecological Economics*, 2001, 37: 257-270.
- XU Z M, CHENG G D, ZHANG Z Q, et al. Applying contingent valuation in China to measure the total economic value of restoring ecosystem services in Ejina region [J]. *Ecological Economics*, 2003, 44: 345-358.





# 塔里木河下游应急输水后的生态响应研究进展

弋良朋 \*

(中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐 830011)

## A Review of the Study of Ecological Responses to Artificial Water-recharge of the Lower Reaches of Tarim River, China

Yi Liang-peng \*

(Xinjiang Institute of Ecology and Geography, CAS, Urumqi 830011, China)

**摘 要** 跨区域输水是人类为改善自己的生存环境、发展经济而采取的优化水资源配置的大规模措施, 目前许多国家都在施行。塔里木河生态是近年来国内外关注的热点领域之一。作为治理塔里木河环境整治最重要的方面之一, 应急输水对塔里木河下游生态系统的结构、功能和动态方面具有十分重要而独特的作用。根据近年塔里木河下游生态输水前后地下水位、水质、植被等项内容的研究资料, 本文综述了塔里木河下游应急输水对地下水位、水质和植被等的影响, 阐明了输水与当地生态的响应过程, 探讨了地下水位与天然植被生长、恢复的相互关系。在对已有成果进行综合分析的基础上, 就目前应急输水中亟待解决的相关问题提出了建议。

**关键词** 塔里木河下游; 输水; 生态响应; 综述

**Abstract** Region water diversion is an efficient measure that can improve environment and develop economy, and it can optimize the configure of water resource. Many countries have carried through the program. The ecological issue of Tarim River is one of hotspot fields attracting attention at home and abroad. In order to rescue strategic “green corridor” in the lower reaches of Tarim River, artificial water-recharge engineering has been brought into effect since May 2000. As the most important part of harnessing of Tarim River, artificial water-recharge is very important and critical for the structure, function and dynamics of ecosystem of the lower reaches of Tarim River. Water was arrived at Taitema

基金项目: 中国科学院知识创新项目 (KZCX1-08-02) 和新疆生态与地理研究所所长基金 (20046013) 共同资助。

\* 通讯作者: yiliangp@ mails. gucas. ac. cn



Lake, the terminal lake of lower reaches in Tarim River. Combined with the ecological water transportation, nine monitoring sections of groundwater were distributed along the Qiwenkur River from Daxihaizi reservoir to Taitema Lake in the lower reaches of Tarim River. Such monitoring contents as groundwater, groundwater quality, soil, vegetation, physiology of plant and animalcule were carried out before and after ecological water transportation at these sections. With several years monitoring in lower reaches of Tarim River, abundant data were accumulated. Based on the change of shallow groundwater level, waterborne salt and ecological restoration process of vegetation after conducting ecological water transportation, physiological, ecological responses of vegetation to the change of groundwater and its change process were reviewed after conducting ecological water transportation under the condition of extreme drought in detail. Ecological requiring water quantity and optimal ecological groundwater level maintaining ecological safety were confirmed in the lower reaches of Tarim River. According to research information during recent several years, we analyze the surface water transportation effect on vegetation and the change range of groundwater level, water qualities, biodiversity, geology and physiognomy process. Some emergent questions are presented in the studies of artificial water-recharge.

**Key words** the lower reaches of Tarim River; water-recharge; ecological response; review

## 1. 前言

年降雨量和水资源在时间和空间上的分布不均,使得人们在水资源开发中要增加蓄水设施以进行时间上的调节,进行远距离输水以求在空间上合理分配。跨区域输水是解决水资源地区分布不均和供需矛盾的一项有效措施,也是促进缺水地区国民经济发展与水资源综合利用的重要途径之一,这种方式已日益引起了国际社会的广泛重视。据不完全统计,世界正在进行和已经进行的输水项目已达 160 多项,分布在 24 个国家,并且经济效益和社会效益明显(方妍, 2005)。绝大多数国家的输水是从水量丰沛的流域向缺水流域调水,主要用于灌溉、工业、生活、航运,如俄罗斯的欧洲西北部分的苏霍纳河、奥涅加河和拉多加湖等跨过分水岭至伏尔加河上游雷宾斯克水库引水,除灌溉外还补充里海的水以便抬高水位,发展渔业和改善环境;印度布拉马谱拉河往恒河的调水主要是航运的需要,其次还有控制盐碱活动的枯水期水量的要求;伊拉克的格里斯—萨萨尔湖—幼发拉底河输水,大大地减少了调出水地区的洪水灾害,而且在萨萨尔湖蓄水后,其附近地区尤其是贝吉周围,沙丘的形成和移动已极大地减缓了,从而有效地保障了该地区居民生命财产免遭损失。

塔里木河是我国最大的内陆河,全长 1321 km,流域面积 102 万  $\text{km}^2$ ,是新疆南部干旱地区居民的“母亲河”。20 世纪 50~70 年代,由于流域内大规模开荒造田,用水猛增,塔里木河下游 320 km 河道完全干涸,两岸大面积柽柳、胡杨林生态系统严重退化,沙漠化过程加剧发展,“绿色走廊”危在旦夕(周兴佳和李崇舜, 1983; 宋郁东等, 2000)。为遏制塔里木河流域生态恶化之势,从 2001 年开始,国家投资 107 亿元实施了塔里木河流域近期综合治理工程,其中包括通过地表河道输水来抬升两岸地下水位,拯救日益衰败的天然植被。2000 年 5 月至 2005 年 6 月新疆连续向塔里木河下游实施了 7 次应急输水,输水线路主要从博斯腾湖至塔里木河下游尾间的台特马湖,全长 927 km,从博斯腾湖和塔里木河上中游共调水 25.2 亿  $\text{m}^3$ ,下游河道共受水 15.8 亿  $\text{m}^3$ ,疏浚河道 216 km,新建和加固堤防 130 km,结束了下游河道断流近 30 年的历史。

(周森和王亚春, 2005)。连续的输水, 使塔里木河下游生态有所恢复, 这些是塔里木河治理的重大突破。

从第一次应急输水开始, 许多人对输水后下游的生态做了大量的监测和研究, 本文对塔里木河下游应急输水后的生态响应研究做一综述, 以解读塔里木河下游断流河道间歇性输水与环境的响应过程, 探讨维持干旱区内陆河流域生态系统稳定的生态水文学机理, 进而为加速塔里木河下游受损生态系统的重建, 指导干旱区生态恢复提供科学依据, 也为今后继续输水和实行水资源统一管理、合理调配及生态环境综合治理提供经验, 为其他地区实施类似工程提供参考。

## 2. 塔里木河下游应急输水后地下水的响应

在大西海子水库以下, 塔里木河分为两支, 西侧一支为老塔里木河, 东侧一支为齐文阔尔河, 两个支流在流经 145 km 的阿拉干附近汇合。6 次应急输水主要沿齐文阔尔河输送。随着生态水流的到来, 该地区生态环境发生了明显的变化, 直接反映在输水河道周围地下水的动态变化以及下游植被的响应上。为了从整体上了解塔里木河下游地下水位的动态变化, 沿塔里木河下游输水河道长约 320 km 的河道垂直方向上按一定间距布设了监测断面, 分别位于阿克墩、亚合甫马汗、英苏、阿布达勒、喀尔达依、十五道班、阿拉干、依干不及麻和考干等地; 在每个断面上沿河道垂直方向按一定间距, 50 m, 100 m, 200 m, 300 m, 400 m, 500 m, 800 m, 1 000 m 布设监测井; 定期进行观测和取样, 连续监测地下水位和地下水水质 (图 1) (郑丹等, 2004; 邓铭江, 2005)。



图 1 塔里木河下游位置及监测断面布局示意图

Fig. 1 Location of the lower reaches of Tarim River and sketch of the groundwater-monitoring sections

### 2.1 地下水位的变化

2000 年 5 月至 2003 年 10 月共完成了 5 次向塔里木河下游应急输水, 5 次输水除少部分消耗于河湖水面蒸发外, 绝大部分补给了河道两侧地下水并供植被消耗。从沿途各河段区间水量消耗的分布情况看, 大西海子至阿拉干消耗水量占总水量的 76%; 阿拉干至台特马湖消耗水量占 20.8%; 进入台特马湖水量占 3.2% (邓铭江, 2004)。在输水期间, 由于河水水位远高于地下水位, 河道两侧局部范围内的水力坡度迅速增大, 地下水由河中心向两侧及下游方向的径流排泄运动增强, 河道两侧 300 m 范围内的地下水位回升较快, 而在离河道较远处的区域则表现出了一定的滞后性。5 次输水后各主要监测断面不同离河距离的地下水位上升/埋深值详见表 1 (邓铭



江, 2005)。

表 1 5 次输水后各监测断面地下水位上升/埋深值 (m) 统计

Table 1 Statistical data of buried depth of groundwater table in monitoring sections after five water transferring

离河距离	河岸	100 m	500 m	1 000 m	影响范围/埋深 (m)
英苏	8.0/1.0	7.0/2.0	4.0/5.0	1.5/7.0	1 700/9.0
喀尔达依	6.5/3.0	6.0/3.4	3.2/5.0	1.8/7.0	1 600/8.2
阿拉干	5.6/5.2	5.0/5.5	3.5/6.7	1.5/8.0	1 300/9.5
依干不及麻	5.5/3.0	4.8/3.0	2.5/6.3	0.5/7.5	1 150/8.0
老英苏	5.5/2.5	4.4/3.5	1.0/8.0	0/8.3	1 000/8.3
博孜库勒	4.8/3.8	3.8/4.7	0.8/6.8	0/8.0	900/8.0

在实施应急输水前, 由于断流时间长, 地下水位与距河道远近已经不存在线性关系。下游地下水普遍下降到 8~12 m (2000 年 5 月测)。向塔里木河下游应急输水后, 沿输水河道附近地下水位大幅度抬升, 通过对河道 1 000 m 内所有井的地下水位统计表明, 地下水位在 9 个断面的平均升幅达到 50%, 其中约 55% 的监测井水位已在 4 m 附近 (2002 年 11 月) (赵文智和程国栋, 2000)。由于目前采取沿自然河道“线性输水”的方式, 地下水位变化特点表现为: 沿输水河道中轴线向两侧, 地下水位升幅呈逐渐减少的趋势, 地下水位对生态输水的响应程度由上而下逐渐减弱。距放水口较近的阿克墩、英苏断面的地下水位响应敏感, 抬升和下降幅度基本一致; 距放水口较远的依干不及麻、考干断面的地下水位抬升与下降情况表现出一定的滞后性; 距放水口较远位置的断面地下水位埋深较深, 放水后其水位抬升下降幅度变化远小于距放水口较近位置的断面。从 5 次输水过程中的地下水位测定情况分析表明, 地下水位的抬升幅度主要与输水量的大小和放水持续时间有关, 并呈一定的正相关关系 (李卫红等, 2003a)。

生态输水后地下水位发生了显著变化, 输水后的地下水位与距输水河道的距离存在相关性, 说明地下水位的大幅变化完全是生态输水的结果。输水后地下水位抬升的过程远较输水停止后回落的过程要强烈。地下水位的响应随着输水次数和持续时间的增加而日益明显。输水后, 地下水位升高的速度以及波动幅度随距离的增加在纵横两个方向上均逐渐趋缓, 每次输水均实现了地下水响应范围的扩大, 离河较近地区的地下水位与生态输水的开始和结束具有明显的同步性, 而离河道较远地区的地下水位在响应时间上存在滞后性, 这一时间要到几个月甚至几年后才会完全表现出来。塔里木河下游地区气候极端干旱且蒸发强烈, 当地下水位超过极限蒸发水位后, 输水对地下水抬升的作用明显趋缓 (徐海量等, 2004; 郑丹等, 2004)。

在干旱地区影响植被生长的主要因素是土壤水分和盐分, 而土壤中的水分和盐分都和地下水位的高低有关, 地下水位过高, 在强烈的蒸发条件下, 溶解于地下水中的盐分可在表土聚积, 使土壤发生强烈次生盐渍化, 不利于植物生长; 地下水位过低, 地下水不能通过毛管上升到植物根系层, 使土壤干旱、植被衰败、发生沙质荒漠化 (宋长春等, 2002; 严登华等, 2002; 贾宝全和许英勤, 1998; Thoms and Sheldon, 2000)。因此, 既能减少地下水强烈蒸发返盐, 又不造成土壤干旱而影响植物生长的地下水位是较为合理的生态地下水位。塔里木河下游应急生态输水工程改善了该区水资源匮乏的现状, 地下水的平均水位从输水前的 8.25 m 升至输水后的 4.13 m, 相应地, 地表植被也出现明显的响应。但是, 在不同河段由于过水时间、耗水量等因素的差异, 造成输水后水位差异较大。以既能减少地下水强烈蒸发返盐, 又不造成土壤干旱而影响植物生长的

合理生态水位作为评价标准,对输水后不同河段的地下水位进行分析表明,目前英苏至阿拉干段的地下水位 2.97~4.8 m,是比较理想的水位;大西海子至英苏段水位较高,可能出现次生盐渍化;阿拉干至台特马湖段地下水位太低,不利于植被的自然恢复(徐海量等,2003a)。

## 2.2 地下水水质的变化

塔里木河下游地处塔克拉玛干沙漠和库鲁克沙漠之间,是塔里木盆地地势最低洼处,上、中游的易溶性盐类被地表和地下水流携带到下游,使其成为流域的聚盐地(李香云等,2001)。因此,造成塔里木河下游地下水的含盐量普遍较高,输水前阿克墩、亚合甫马汗、英苏、阿布达勒、喀尔达依、阿拉干、依干不及麻、考干等地地下水的矿化度分别是 2.84 g/L, 1.87 g/L, 1.50 g/L, 2.11 g/L, 1.69 g/L, 4.16 g/L, 11.16 g/L, 37.28 g/L。输水后地下水的矿化度有较明显的变化,但是变化的特点与地下水位有很强的相关性,当水位出现快速升高时,矿化度一般不降反升,例如在阿克墩,当水位由输水前的 5.58 m 快速抬升到 2.53 m 时,矿化度由 2.84 g/L 升高到 3.13 g/L;而当水位回落时,盐分却呈现下降的走势,表现为随着地下水位由 2.53 m 回落到 3.56 m,矿化度也下降到 1.88 g/L(李卫红等,2003)。造成这种变化的原因在于本区土壤含盐量较高,水位升高时将大量盐溶解,各断面水质状况在时间变化上也存在基本相似的变化趋势,随地下水位的抬升,地下水矿化度呈明显升高趋势。输水对水质矿化度的影响较为明显,而对水质 pH 变化的影响较小。地下水的化学类型从  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  型四元水逐渐演化为  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  型二元水(张宏锋等,2003)。

输水后,地下水的盐分变化远比水位的变化要复杂,但是总体上看水质是好转的。输往塔里木河下游的水主要来自博斯腾湖,其矿化度约为 1.0 g/L(李卫红等,2003),有利于下游地区地下水水质的改善,但由于断流多年,土壤异常干燥,地下水的运动速度缓慢,塔里木河下游区又属于盐分聚集带,土壤和地下水中盐分含量高,输水能冲淡地下水的相对含盐量,但其绝对含盐量并未降低,因此,只有采取一系列工程和管理措施才能使下游水质真正好转。

距离河道 1 050 m 处的地下水水质在第五次输水后才开始受到影响(陈永金等,2005)。说明输水对距离河道较远处地下水水质影响的迟滞和微弱,塔里木河下游输水对地下水水质的影响程度随着与输水河道距离的增加而减弱。根据输水过程中地下水水化学升降变化的特征,地下水水质对应急输水的响应过程如下:在受输水影响的初期,河道中的水以侧渗方式补充过来,同时把盐分从离河道更近处带过来,导致地下水离子含量和矿化度升高;当更多的水分补充过来时,对盐分含量较高的溶液起到稀释冲淡作用。另外,水平侧渗的水分向更远处扩散,也把盐分带到更远处,因此离子含量和矿化度降低。当地下水位升高到距离地表很近的位置时由于土壤中的高含量盐分溶解于水中,使得地下水中离子含量和矿化度上升,所以,在继续进行间歇性应急输水时还要考虑到既能扩大输水的影响范围,同时尽力避免地下水位过高,使得地下水中盐分含量过高。

## 3. 塔里木河下游应急输水后植被的响应

### 3.1 输水前塔里木河下游植被的基本状况

由于塔里木河下游经过近 30 年断流,地下水水位超过绝大多数下游植物的生长临界水位,由地下水维系的植被群落已出现严重退化,下游植被已由河岸胡杨林、盐化草甸及盐柴类灌木向仅残存个别植株的沙漠过渡(郑丹等,2004;徐海量等,2004;毛德华,1998)。首先是草本的退化,其次是胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)的退化(枯梢、枯枝、枯株增加,郁闭度减少),



一般胡杨冠幅不到  $3 \text{ m}^2$ , 胡杨林面积大幅减少。据统计, 下游地区的胡杨林面积由 20 世纪 50 年代的  $5.3 \times 10^4 \text{ hm}^2$  减少到现在的  $0.67 \times 10^4 \text{ hm}^2$  (刘晏良, 2000)。耐旱性较强的灌木类型, 随干旱程度的加剧及荒漠化进程的加剧, 种群结构也在发生变化, 铃铛刺 [*Halimodendron halodendron* (Pall.) Voss]、罗布麻 (*Apocynum venetum* L.)、白刺 (*Nitraria sibirica* Pall.)、芦苇 [*Phragmites australis* (Car.) Trin. ex Steud.] 等植物大片死亡, 只有一些耐旱性极强的怪柳 (*Tamarix* spp.) 和盐穗木 [*Halostachys caspica* (Bieb.) C. A. Mey.] 生长在垂死状态下。从植被退化的特点看: 优势种群年龄结构向老年化转移, 老龄个体占绝对多数, 中幼龄个体很少, 更新不成功; 生物多样性下降, 生产力下降, 植物种类发生明显变化, 植物种类单一, 在  $100 \text{ m}^2$  内多数情况下只分布着一到两个耐干旱的植被种; 植被盖度变小, 一般情况下调查的植被盖度在 2% 左右。从植被的分布看: 表现为分布的不连续和无规律性, 由于流水侵蚀形成的流水地貌已经完全被风蚀沙化形成的风蚀地貌所取代, 地表植被尤其是灌木和草本植被的分布和盖度与距河道远近已不存在明显的相关关系 (徐海量等, 2004c)。从植被群落类型看: 由草地逐渐向荒漠胡杨林再到荒漠盐化草甸转变, 说明该地区的植被正在逐步退化乃至消亡 (包维楷, 1999; 许木启, 1998)。

### 3.2 输水后塔里木河下游地表植被的响应范围

在沿塔里木河下游每个监测断面在一定时间进行地表植被调查, 结合其他环境要素进行植被盖度、长势、种类等的定点观测。结果发现, 通过塔里木河下游的生态输水工程, 塔里木河下游河道周围一定范围内的植被响应是明显的, 其表现与离输水河道的距离呈现密切的联系, 在距离河道 150 m 范围内, 随着地下水位的大幅抬升, 草本植被得以重新萌发, 种类也随之明显增加, 而一些当地生长的乔灌木植被对此反应更加明显, 中老年林重新恢复了生机。随着离输水河道距离的加大, 这种变化逐渐减弱, 在 150 ~ 350 m 范围内, 虽然地下水位仍然大幅抬升, 但是没有达到草本植被生长所需要的生长水位, 而灌木和胡杨林对这一水位反应明显, 长势旺盛, 其主要表现是盖度的增加和冠幅的变化。在 350 ~ 700 m 范围内, 地下水变化不大, 此时的地下水位只能满足一些成年胡杨和个别种的怪柳生长, 而多数植被对此的反应很弱, 只有个别洼地可以发现零星的草本植被。到 700 m 以后, 植被的盖度、多样性指数、丰富度指数以及胡杨的冠幅与输水前几乎没有变化 (徐海量等, 2004b; 徐海量等, 2003b; 李霞等, 2004)。所以, 在距河 0 ~ 350 m 范围内为显著影响区间, 在 350 ~ 700 m 范围是中度影响区间, 700 m 以外基本无影响。由于过水时间、区段耗水量、地层结构、土壤类型及植被退化状况等环境要素的差异, 不同河段的影响范围不同, 总体上表现为由上而下逐步递减的趋势。

李卫红等对塔里木河下游不同断面具有代表性的植物输水后的响应范围做了研究, 对塔里木河下游 5 个断面、30 个植物样地的调查和对天然植物当年生小枝的长度、当年生小枝上胡杨的叶数、50 片以上叶长、宽及叶重, 芦苇的高度和叶长、宽、质量等进行了测试分析, 结果发现, 随着输水后地下水位的抬升, 地表植被产生了明显变化。在横向上, 芦苇的反应敏感区范围在 100 ~ 150 m 之间; 对胡杨的横向影响范围在 200 ~ 250 m 之间; 在纵向上, 平均叶数从下游上段至下游下段, 分别较末端断面增加了 57%, 22.2%, 9.2%; 河道两岸横向上对植被的影响范围下游上段较下游下段宽 (李卫红等, 2004; 陈亚宁等, 2004a)。

### 3.3 输水对塔里木河下游地表植被恢复的影响

塔里木河下游植被对生态输水的响应非常明显, 部分抑制了该地区极端严重的草地退化、土地沙化和盐渍化的发展, 并且在一定区域内实现了退化草地的生态恢复。主要表现在: ①部分低洼地上的盐化草甸得到了一定的恢复, 在低洼处发现了长势较好的芦苇、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata*



Batal.)、罗布麻、骆驼刺、猪毛菜 (*Salsola* sp.)、地肤 [*Kochia scoparia* (L.) Schrad.]、多枝怪柳 (*Tamarix ramosissima* Ledeb.) 及刚毛怪柳 (*Tamarix hispida* Willd.) 等, 其中芦苇从植株数到覆盖度皆占绝对优势, 且随地下水位的变化而变化。②盐柴类灌木荒漠植被得到部分恢复。作为隐域性荒漠植被的盐柴类植被 (中国科学院新疆综合考察队, 1978), 要求其生境的土壤水分条件优于地带性超旱生灌木。区域内主要盐柴类灌木, 如怪柳、黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.)、白刺、铃铛刺等得以复生, 许多植株萌发出新的枝芽和叶片, 从而形成新的营养枝和繁殖枝。疏叶骆驼刺 [*Alhagi sparsifolia* (B. Keller. et Shap.) Shap.]、花花柴 [*Karelinia caspica* (Pall.) Less.] 也能正常开花结果, 恢复最好的为多枝怪柳, 说明盐柴类灌木荒漠中, 耐干旱与盐渍的灌木植物恢复势头更好。③根蘖次生胡杨规模有所扩大。胡杨是塔里木河流域荒漠河岸林的主要成分, 也是下游末端绿色走廊的主要建群种。应急输水后, 在一些水分状况较好的地方, 特别是河道转弯处, 老胡杨附近一些根生苗破土而出, 长势普遍较好, 在阿克墩、亚合甫马汗、英苏、阿布达勒、喀尔达依以及阿拉干个别地方, 皆发现有胡杨次生苗存在, 但总体看数量仍然不太多, 地区差异也较大。

由于怪柳科植物不具备蘖生能力, 无次生灌丛, 只有个别的幼枝从已近死亡的怪柳根部长出。在已输水的河道转弯处, 一些地方已形成河漫滩雏形, 其上发现了盐生草 (*Halogeton glomeratus*)、猪毛菜和蒲公英 (*Taraxacum* sp.) 等一年生植物的实生苗, 但未发现胡杨和怪柳的实生苗, 这可能是放水时间和它们的种子成熟和传播时间不一致造成的。

输水历时的长短和输水量与塔里木河下游植被恢复密切相关。从响应程度看, 受地下水位升高影响实现植被恢复的区域, 表现出明显的以输水河道为轴心向两侧递减的趋势, 在近河道恢复非常明显, 植物的种类和覆盖度明显增加, 但是随着距输水河道距离的增加这种变化逐渐减弱甚至消失。而不同植被由于抗旱程度和对地下水变化适应程度的不同, 在响应时间上和空间上表现各异。在近河道水位较高的区域, 芦苇成为主要的优势种; 而在水位较低的区域, 罗布麻、骆驼刺和花花柴表现更加突出。从总体上看, 植被恢复受原生植被分布格局和环境条件的限制而表现出不连续性和区域性 (徐海量等, 2003c)。

由于河水漫溢, 出现了一些草本植被大面积恢复的地区, 一些新出现的种是随河水落种更新还是本地残余种子的萌发尚需进一步研究来确定。

一些原来本区域内分布的超旱生植物, 如盐节木 (*Halocnemum strobilaceum* (Pall.) M. Bied.)、霸王 (*Zygophyllum* sp.) 及盐柴类的盐爪爪 (*Kalidium* sp.) 等, 在应急输水后, 也未见踪迹 (杨戈, 2004)。在下游末段 (如考干以下) 近 30 年的断流, 不少物种在该区域内消失、灭绝, 甚至形成了大片的裸地和沙地, 这一变化在很大程度上是不可逆的。每一物种在一定的区域内的变化过程, 是一个连续的由量变到质变的过程, 以水为中心的自然生态环境对植物体的变化有着深刻的影响。随着物种的迁移灭绝以及新物种的产生, 原有的植物区系成分将被改变, 这种变化是不可逆的 (Bartlein, 1988)。对塔里木河下游末端的植被而言, 常年断流缺水造成的极端干旱, 成为对每一植物个体的严峻考验与筛选, 它们中的许多物种, 即使在水分状况完全恢复的情况下, 也会因种源、土壤含盐量等诸多因素而无法自然恢复, 例如一年生浅根系植物, 原来老的种子已丧失活力, 或因偶然遇水萌发后又遭旱杀, 在无新的种源情况下, 就是充分给水, 也无法恢复。一些灌木 (如怪柳、白刺、铃铛刺等) 经多年干旱, 其根部已枯干致死, 也无法再生出新的个体。以胡杨为代表的乔木, 在其侧根也干枯死亡的情况下, 恢复供水也无法使其分生出根生苗。所有这些植物只能靠外界传播过来的种子, 在已恢复水分状况的地区, 通过实生苗重新生长繁衍。因此, 物种灭绝的不可逆性决定了只靠单纯的几次输水措施, 要想使研究



区域内的植被恢复到历史较好的水平是不可能的。

河水漫溢对于塔里木河下游的主要建群种植物胡杨种子的萌发并形成实生苗极为有利。由于输水时间较短,放水后难于形成局部的低洼湿地与河漫滩,因此影响了胡杨与怪柳的种子更新,它们的种子成熟后,只有飘落在较湿润的土壤上才能萌发形成实生苗,若飘落在干燥的土壤上,很快会丧失萌发能力,特别是胡杨种子,寿命极短,由于遇不到适宜的条件而大量死亡。对多数一年生及多年生植物而言,充分的水分供给,也是其萌发的必要条件,它们中的一些种,虽不像胡杨种子一样短命,但洒落在干旱土壤上的休眠时间也是有限的。因此在经常输水的情况下,这些植物才有可能在一定区域内正常的生存繁衍,人为地制造河水漫溢对该地区植被的恢复是有益的(杨戈等,2004)。

### 3.4 植物生理指标对塔里木河下游应急输水的响应

生物与环境是相互影响、相互作用的,生物对环境条件的缓慢而微小的变化具有一定的调整适应能力,环境条件的变化同样也可以通过生物体内一些微观指标的变化来指示。从塔里木河下游生态输水前后植物生理指标的变化上也深刻地揭示和验证了这一特点。

陈亚宁等(2004)结合地下水监测井位置,从河边开始设置了不同样地,采集怪柳和芦苇的鲜叶,低温保存,当天做前处理(烘干或冰冻),通过分析植物的生理特性,包括测试细胞水势调节物脯氨酸(Pro)、细胞膜系统保护酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和膜脂过氧化的主要产物丙二醛(MDA)等,以了解塔里木河下游天然植被对输水的响应过程,探明应急输水对天然植被的有效影响范围。从植物生理指标测试表明,塔里木河下游的应急输水对植物生长、复壮产生了明显效果。从Pro和SOD酶活性的变化分析,当地下水埋深度大于3.5 m,芦苇的Pro含量出现迅速积累,表明芦苇生长受到水分胁迫;怪柳的Pro和POD含量在地下水位降到5 m时,才表现出显著增加态势。结合野外样地的实际调查分析推测,芦苇和怪柳的胁迫地下水位分别为3.5 m和5 m。SOD与POD指标均为膜系统保护酶,但其活性表现有时间上的互补性,在芦苇和怪柳两种植物上都表现出了相同的规律,干旱胁迫相对较弱时POD活性高,当干旱胁迫加重时POD活性降低,而SOD活性提高,并且这两种保护酶的联合作用,在细胞受水分胁迫损害时能有效清除超氧离子,防御膜脂过氧化,减轻质膜受损,减少MDA增生,有效保护了膜系统的健康,从MDA指标的变化特点得到了证实,这种生理上的互补作用是对干旱胁迫逆境的一种生理适应性表现。

徐海量等(2003d)通过分析应急输水前后胡杨体内的脯氨酸、脱落酸和叶片含水量等生理指标的变化,就生态输水对塔里木河下游胡杨的影响进行了研究。通过对胡杨在同一时间段内受到输水和未受到输水影响发生的生理指标的变化研究,可以清楚地说明,生态输水对胡杨生长的影响是显著的。从胡杨叶相对含水量、脯氨酸、脱落酸这三个指标的变化上看,出现叶含水量减少和脯氨酸、脱落酸积累的增加是胡杨对水分亏缺的一种生理反应。其变化趋势与输水后地下水位动态变化基本一致,即随着地下水位的降低,胡杨通过体内脯氨酸的积累,提高渗透调节能力,保持其原生质与环境的渗透平衡;同时,通过关闭气孔、减少蒸腾失水以防止水分散失,抵御水分胁迫,使胡杨在一定干旱环境下继续生存。而当水分条件得到好转时,这些积累的物质又会不断分解转化成其他形式,从而保证植物能更好地适应新的生存环境。脯氨酸和脱落酸在积累和分解上具有明显的一致性,基本保持同步,说明胡杨在对水分亏缺上是采用多种生理反应来适应环境的变化。输水后各地地下水位均有所上升,胡杨受到的生理胁迫降低,胡杨叶片角质层厚度、维管束导管管腔直径及管壁厚度皆随地下水位的上升而减小。随着地下水位的上升,地下水含盐量分别提高1.76~2.47倍,输水效果由于盐对植物的生理胁迫作用的增加而有所减弱。

(Chen *et al.*, 2004)。

当植物处于逆境胁迫(干旱、寒冷、高温等)时,细胞内氧自由基产生和清除的平衡会遭到破坏,积累的氧自由基首先攻击膜系统,膜脂脂肪酸中的不饱和键被过氧化,最终形成丙二醛(MDA)(周瑞莲和王海鸥,1999)。丙二醛含量是反映细胞膜脂质过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标,也是反映水分胁迫对植物造成伤害的重要参数(张木清等,1997)。在塔里木河下游极端干旱区,由于河道长期断流,随着地下水位埋深加大,水分胁迫程度的加深,胡杨叶片中MDA含量明显增加,脂质过氧化作用加强,胡杨遭受干旱伤害程度不断加深,胡杨叶片中MDA含量在不同地下水位状态下的变化,正是胡杨在干旱环境下的一种生理反应。胡杨叶片MDA含量的增加幅度在地下水位3.12~10.56 m之间出现了3个高峰点,反映了胡杨受水分胁迫状态和程度的质的变化。第一个高峰点(地下水位为3.12~4.42 m之间),胡杨叶片MDA含量是后两个峰的1/2,结合塔里木河下游野外植被样方的调查结果分析,推断3.12~4.42 m的地下水位范围是胡杨遭受水分胁迫的临界区,胡杨的生长发育开始受到水分胁迫;第二个高峰点在5.78~6.46 m之间,表明胡杨在水分胁迫下,细胞膜脂质过氧化作用正在加速进行,胡杨遭受的水分胁迫加重,处于中度水分胁迫状态,胡杨的生长发育已受到明显的抑制;第三个高峰点在8.89~9.74 m之间,胡杨叶片MDA含量的增幅要比第二高峰点还多17.4%,表明胡杨生长已遭受重度水分胁迫,胡杨长势处于极度衰败状态。因此,可以认为,第三个高峰点出现的地下水位(8.89~9.74 m)是胡杨生存(死亡)的临界阈值(陈亚鹏等,2004)。通过对胡杨叶片的脯氨酸(Pro),超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)等生理指标的测试分析,推测胡杨的胁迫地下水位为4.5 m(陈亚宁等,2004)。

#### 4. 塔里木河下游应急输水后生物多样性的变化

输水后地下水埋深的变化最明显地表现在植物的变化上,天然植被的组成、分布及长势对输水有直接的响应,反映物种数量变化和物种的生物多样性程度的Simpson多样性指数、McIntosh均匀度指数和Margalef丰富度指数输水后在大多数样地均有所增加(陈亚宁等,2004c)。

塔里木河下游段的大西海子水库至台特马湖,在断流后,湿地消失,荒漠化加剧,珍贵稀有野生动物迁离此地。一些特有种类处于濒危或绝迹,塔里木河下游约200 km形成了一个生态断带。伴随输水过程,沿输水河道齐文阔尔河两岸植被复苏,使之成为区域生态系统结构最复杂、功能最全面、生产力最高的荒漠区隐域性带状景观,为野生动物提供了食物、饮水、隐蔽、栖息的条件。有鹅喉羚(*Gazella subgutturosa*)等野生动物到河边饮水,鸛(*Ciconia* sp.)类等水禽在水中觅食鱼、虾。调查记录有鱼类11种、两栖类1种、爬行类4种、鸟类25种、兽类2种,以荒漠类群动物为主。在区域性物种中,各类都有代表种分布(马鸣,2001)。如鱼类的塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)、爬行类的新疆鬣蜥(*Agama stoliczkana*)、鸟类的白尾地鸦(*Podoces biddulphi*)、兽类的塔里木兔(*Lepus yarkandensis*)等,表现出干旱区荒漠极端环境下的抗高温、严寒、干燥、耐盐碱等抗逆性特点,在整个动物界是不可多得的,是抗逆物种的品种库和基因库(李卫红等,2003b)。



## 5. 塔里木河下游应急输水对地质地貌的影响

大西海子水库以下原属于塔里木河下游的冲积泛滥平原,地表物质由细沙和粉沙组成,抗蚀能力弱,地表为游荡性辫状水系,河曲发育,河床坡缓、宽浅。大西海子水库的建成,使下游断流,其下游地质地貌过程也发生了很大的变化,由风力和水力共同作用变为单一的风力作用,加之区域荒漠植被的加剧退化,风蚀、风积作用不断加强,在阿克墩一带可以看到较好的“V”形河床;而在亚合甫马汗以下,河床形态呈不规则的变化;在阿布达勒和喀尔达依一带,由于强烈的风蚀作用,河床形态呈现为浅而宽缓的“U”形,并有多处河床被积沙挤占,严重影响河水的输送。实施应急输水后,河水在输送过程中,沿风蚀沟槽下切,侧蚀和溯源侵蚀加剧,河槽得到较好的水力修复,为以后的输水创造了较好的条件,使输水过程大为加快(李卫红等,2003b)。

## 6. 其他研究

博斯腾湖位于大西海子水库西北 530 km 处,是我国最大的内陆淡水湖,部分年份水量很大,如 1999 年、2000 年开都河连续两年丰水注入,使其水位大大超过正常蓄水位 (1 047.50 m),达到历史最高水位 (1 048.95 m) (杜榜清等,2001;徐海量等,2003e),对环湖地区房屋、耕地及人民生命财产造成巨大威胁。通过向塔里木河下游输水,也能减轻博斯腾湖的防洪压力。塔里木河下游的生态输水工程在一定范围内对下游地区的沙漠化带来明显的抑制作用,但影响范围较小,距完全遏止和逆转下游的沙漠化趋势还有很大距离(徐海量等,2004a)。利用遥感定量提取技术及植被盖度信息提取模型,通过输水前与输水后遥感数据的图像解译、分类以及植被指数等方面的对比分析,监测塔里木河应急输水工程对下游绿色走廊生态恢复的效果,并对输水效果进行评价,该方法技术路线易于实现,且具有宏观、快速、准确的特点(闫正龙和汤国安,2004;孙涛等,2004)。

## 7. 结束语

采用沿自然河道“线形”输水方式对植被的影响范围极为有限,距保护“绿色走廊”的目标还有很大距离。为此,应逐步实施双河道输水以及河道输水与面上供水相结合的方式,有计划、分区段地进行面上供水,逐步扩大恢复范围,并在分区段面上供水的基础上,结合塔里木河下游主要建群种胡杨和柽柳的落种时间,优选输水时段,确立每年 8~9 月为最佳输水时期,为种子萌发提供条件,扩大输水的生态效应,对以胡杨为代表的荒漠河岸林生态系统自我恢复和自我更新机制的建立也更加有效(崔旺诚等,2004),同时还可以有效洗盐、压盐,减轻盐渍化和抑制沙漠化,而它的可靠性在新疆很多地区已经得到了证明(张慧等,2000;朱震达和陈广庭,1994)。鉴于输水后地下水在不同断面上响应程度的巨大差异,生态输水工作有必要继续长期开展。

从生态输水的角度考虑,由于本段极端严重的沙漠化和盐渍化,以及极度退化的植被现状,随着今后继续进行的生态输水,必然会带来地下水位的大幅升高,通过复杂的水化学运动,地下水的含盐量将大幅波动,而这一过程对植被的恢复和减轻地表的土地盐渍化意义重大,也将会产生许多新的生态变化,所以,今后还将继续进行监测和研究。

另外, 应急输水对下游生态的影响是多方面的, 在土壤微生物、土壤水化学、植物群落演替、土壤种子库、地表生物结皮等方面还缺乏深入的了解, 一些植物在生理上的响应还不清楚, 因此, 对塔里木河下游输水后的生态响应还应继续深入研究。

塔里木河下游的输水是专门针对改善当地的生态环境而进行的生态输水, 体现了中国政府对于生态建设的高度重视。塔里木河整个流域及其所在的广大地区是世界主要的干旱区之一, 其上中下游和相邻流域的水资源开发过程中的经济与生态的矛盾日趋突出, 塔里木河下游生态系统的急剧退化正是由缺水引起的。并且, 随着流域社会、经济发展和人口的增长, 势必对水资源的压力和需求更为强烈, 生产、生活和生态用水的矛盾更显突出。为此, 能否确保常年都有一定量的水向断流 30 年之久的塔里木河下游输送的问题已引起了人们思考。从干旱区节约和高效地利用水资源, 加快实现塔里木河下游受损生态系统的恢复与重建角度出发, 合理调配水资源, 优化输水方案 (包括输水方式、输水时间等), 成为确保塔里木河下游生态安全的关键所在, 是我们进一步研究的内容。

## 参考文献

- 包维楷. 生态系统退化的过程及其特点 [J]. 生态学杂志, 1999, 18 (2): 36-42.
- 陈亚宁, 李卫红, 陈亚鹏, 等. 新疆塔里木河下游河道生态输水对植被生理的影响研究 [J]. 自然科学进展, 2004a, 14 (6): 665-671.
- 陈亚宁, 李卫红, 陈亚鹏, 等. 新疆塔里木河下游怪柳、芦苇对生态输水的响应 [J]. 冰川冻土, 2004b, 26 (5): 595-601.
- 陈亚宁, 张小雷, 祝向民, 等. 新疆塔里木河下游断流河道输水的生态效应分析 [J]. 中国科学 (D), 2004c, 34 (5): 475-482.
- 陈亚鹏, 陈亚宁, 李卫红, 等. 新疆塔里木河下游生态输水对胡杨叶片 MDA 含量的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10 (4): 408-411.
- 陈永金, 陈亚宁, 李卫红, 等. 塔里木河下游地下水化学特征对生态输水的响应 [J]. 地理学报, 2005, 60 (2): 309-318.
- 崔旺诚, 李卫红, 徐海量. 塔里木河下游输水与生态保育 [J]. 干旱区地理, 2004, 27 (2): 172-178.
- 邓铭江. 塔里木河下游应急输水的水生态环境响应 [J]. 水科学进展, 2005, 16 (4): 47-48.
- 邓铭江. 塔里木河下游应急输水植被恢复响应及生态修复研究 [J]. 中国水利, 2004, 14 (1): 14-17.
- 杜榜清, 张孝亲, 杨岗民. 新疆博斯腾湖向塔里木河下游生态应急输水问题探讨 [J]. 西北水资源与水利工程, 2001, 12 (4): 55-58.
- 方妍. 国外跨流域调水工程及其生态环境影响 [J]. 人民长江, 2005, (10): 26-28.
- 贾宝全, 许英勤. 干旱区生态用水的概念和分类 - 以新疆为例 [J]. 干旱区地理, 1998, 21 (2): 8-12.
- 李卫红, 陈亚鹏, 张宏峰, 等. 塔里木河下游断流河道应急输水与地表植被响应 [J]. 中国沙漠, 2004, 24 (3): 301-305.
- 李卫红, 陈跃滨, 徐海量, 等. 博斯腾湖的水环境保护与可持续利用对策 [J]. 地理研究, 2003a, 22 (2): 185-191.
- 李卫红, 徐海量, 艾合买提·那尤甫. 塔里木河下游输水与生态恢复监测初报 [J]. 干旱区地理, 2003b, 26 (2): 122-128.
- 李霞, 侯平, 朱小虎, 等. 塔里木河下游应急输水植被响应效果调查与初步分析 [J]. 干旱区资源与环境, 2004, 18 (3): 68-73.
- 李香云, 张蓬涛, 章予舒. 塔里木河下游绿色走廊特点及衰败成因分析 [J]. 干旱区研究, 2001, 18 (4): 26-

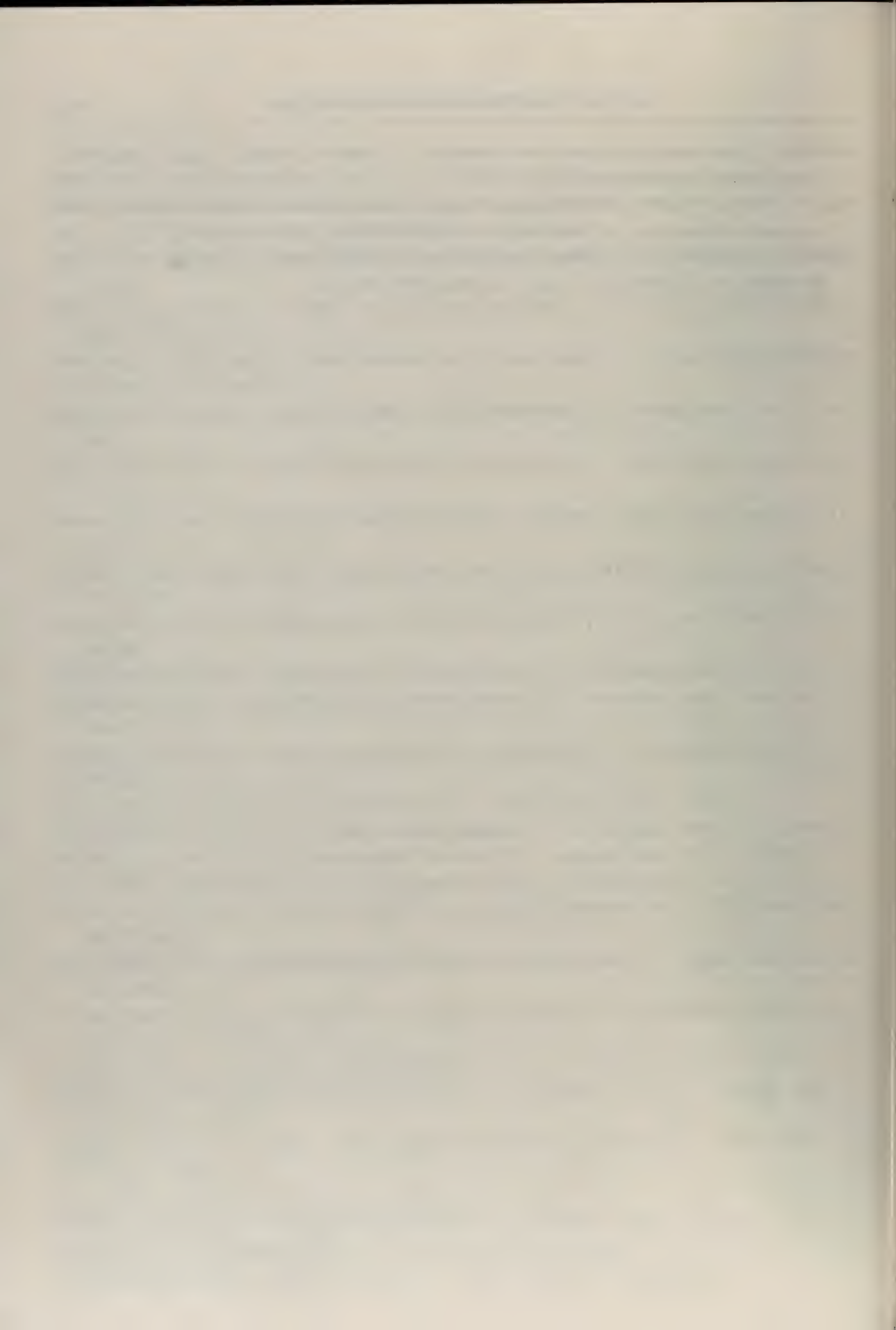


31.

- 刘晏良. 塔里木河中下游实地踏勘报告 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2000: 46-123.
- 毛德华. 塔里木河流域水资源、环境与管理 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1998: 29-36.
- 马鸣. 新疆野生动物的保护问题 [J]. 干旱区地理, 2001, 24 (1): 47-50.
- 宋长春, 邓伟, 李取生, 等. 松嫩平原西部土壤次生盐渍化防治技术研究 [J]. 地理科学, 2002, 22 (5): 610-614.
- 宋郁东, 樊自立, 雷志栋, 等. 中国塔里木河水资源与生态问题研究 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2000. 395-410.
- 孙涛, 李纪人, 杜龙江. 塔里木河下游应急输水前后生态变化遥感监测分析 [J]. 中国水利水电科学研究院学报, 2004, 2 (3): 179-188.
- 徐海量, 陈亚宁, 雷加强. 塔里木河下游生态输水对沙漠化逆转的影响 [J]. 中国沙漠, 2004a, 24 (2): 173-176.
- 徐海量, 陈亚宁, 李卫红. 塔里木河下游生态输水后地下水的响应研究 [J]. 环境科学研究, 2003a, 16 (2): 19-38.
- 徐海量, 陈亚宁, 杨戈. 塔里木河下游生态输水对植被和地下水位的影响 [J]. 环境科学, 2003b, 24 (4): 18-22.
- 徐海量, 宋郁东, 艾合买提·那尤甫. 塔里木河下游生态输水对草地恢复的影响 [J]. 中国草地, 2003c, 25 (6): 17-20.
- 徐海量, 宋郁东, 陈亚宁. 生态输水后塔里木河下游地下水的动态变化 [J]. 中国环境科学, 2003d, 23 (3): 327-331.
- 徐海量, 宋郁东, 陈亚宁. 生态输水后塔里木河下游合理水位探讨 [J]. 水土保持通报 2003e, (23) 5: 22-25.
- 徐海量, 宋郁东, 陈亚宁. 塔里木河下游生态输水影响范围探讨 [J]. 干旱区资源与环境, 2004b, 18 (1): 54-58.
- 徐海量, 宋郁东, 陈亚宁. 塔里木河下游生态输水后地下水变化规律研究 [J]. 水科学进展, 2004c, 15 (2): 223-226.
- 许木启, 黄玉瑶. 受损水域生态系统恢复与重建研究 [J]. 生态学报, 1998, 18 (5): 547-555.
- 闫正龙, 汤国安. 塔里木河下游生态应急输水植被恢复的遥感监测 [J]. 水土保持通报, 2004, 25 (3): 58-60.
- 严登华, 何岩, 邓伟, 等. 东辽河流域坡面系统生态需水研究 [J]. 地理学报, 2002, 57 (6): 685-691.
- 杨戈, 郭永平. 塔里木河下游末端实施生态输水后植被变化与展望 [J]. 中国沙漠, 2004, 24 (2): 167-172.
- 张宏锋, 李卫红, 葛洪涛, 等. 塔里木河下游地下水位与水化学成分关联度排序分析 [J]. 干旱区地理, 2003, 26 (3): 22-25.
- 张慧, 马英杰, 季方, 等. 塔里木河地表及地下水中氟离子的分布和变化规律 [J]. 环境科学学报, 2000, 20 (5): 579-583.
- 张木清, 陈如凯, 高三基, 等. 甘蔗基因型对水分胁迫的形态生理响应 [J]. 中国农业科学, 1997, 30 (6): 72-77.
- 赵文智, 程国栋. 人类土地利用的主要生态后果及其缓解对策 [J]. 中国沙漠, 2000, 20 (4): 369-372.
- 郑丹, 陈亚宁, 薛燕. 新疆塔里木河下游断流河道输水对地下水变化的影响分析 [J]. 干旱区地理, 2004, 27 (2): 216-220.
- 周瑞莲, 王海鸥. 在干旱、高温胁迫中沙生植物抗脱水性与膜脂过氧化关系的研究 [J]. 中国沙漠, 1999, 19 (增刊1): 59-64.
- 周森, 王亚春. 塔里木河干流治理综述 [J]. 人民黄河, 2005, 27 (2): 47-48.
- 周兴佳, 李崇舜. 塔里木河下游绿色走廊的沙漠化及其防治 [J]. 中国沙漠, 1983, 3 (1): 31-43.
- 朱震达, 陈广庭. 中国土地沙质荒漠化 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 20-33.
- 中国科学院新疆综合考察队. 新疆植被及其利用 [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 207-215.

- BARTLEIN P J. Late-tertiary and quaternary Palaeoenvironments [A]. Huntley B. Webb III. Vegetation History [C]. Kluwer: Academic Publishers. 1988: 113-152.
- Chen Y N, WANG Q, RUAN X, et al. Physiological response of *Populus euphratica* to artificial water-recharge of the lower reaches of Tarim River [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46 (12): 1393-1401.
- THOMS M C, SHELDON F. Water resource development and hydrological change in a large dry land river: the Barwonarling River, Australia [J]. Journal of Hydrology, 2000, 228: 10-21.





# 生态教育

Ecological Education in Higher Education





# 大学生态学教学及教材建设进展：国内外比较

段昌群\* 常学秀 和树庄

(云南大学环境科学系暨环境科学与生态修复研究所, 昆明 650091)

## Progress in the Teaching and Textbook Construction in Ecology Program of Universities: Comparative Studies

Duan Chang-qun\* Chang Xue-xiu He Shu-zhuang

(Department of Environmental Sciences & Institute of Environmental Sciences and Ecological Restoration, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**摘 要** 中国经济社会发展面临来自资源环境问题的挑战, 迫切需要培养大量高素质的生态学人才。生态学的课程教学及其教材建设成为培养高水平人才的重要基本支持条件。本文通过对国内外生态学教学现状、教学安排及课程设置的比较, 评述分析了国内外教材建设环境和主流教材的特点, 对我国大学未来生态学教材建设提出了建议。

**关键词** 教学改革; 教材建设; 生态学专业; 大学教学

**Abstract** The increasingly great challenge from the huge pressure of the satisfaction of natural resources and ecological environments to meet the needs of rapid social and economic development in today's China requires large amounts of human resources fully recognized in ecology and environmental issues. In order to make college students harvested in the knowledge and able to solve ecological problems, courses and curricula, relevant textbook systems in ecology should be well organized and constructed. This paper generally reviewed the situation of ecology program in universities in China and abroad, and some main textbooks in ecology were documented, and several ideas and suggestions were also put forward in textbook system construction in future China.

**Key words** organization of courses and curricula; construction of textbook systems; university

基金项目: 教育部教材研究项目, 生态学国家精品课程建设项目, 高等学校特色专业建设项目 (TS10528) 共同资助。

\* 通讯作者: chqduan@yun.edu.cn



teaching; ecology program

教材是大学本科教育及其人才培养的知识载体,教材的编写及使用与人才培养的定位、教学的组织密不可分。为了对国内外高等学校生态学教材进行比较分析,必须对国内外生态学专业的教育状况进行分析,调研教学安排和课程设置,进而对教材的编写和建设提出建议。

## 1. 国内外生态学教学现状

作为研究生物与环境关系规律的生态学,其本质就是探究生物生存的问题。经过环境危机困扰和认真反思后,人类接受了这个事实:人类只是地球生物圈大家庭的一个成员,人类并不能逃脱作为其生存环境的地球的种种变化对其前途的影响,人类社会只有遵循生态规律,与其他生物和谐相处,才能走向可持续发展(美国总统科学技术办公室,1999;Graham *et al.*, 2002)。现代生态学不仅以认识自然生态规律、探索生物奥秘为其使命,而且在指导人类如何保护和合理利用生物资源方面也发挥着独特作用。生态学是现代社会指导人类行为准则的一门重要科学(Palmer *et al.*, 2005; The Ecological Vision Committee, 2004)。

正因为生态学的特殊地位和作用,国内外著名大学纷纷把生态学专业作为自己的办学重点之一(段昌群, 2001; The Ecological Vision Committee, 2004)。同时,由于不同国家和地区,甚至不同的学校面临的生态环境问题不同,对人才培养的定位也有显著差异,从而在教学方面也存在一定的差异。

### 1.1 国外生态学教学情况

#### 1.1.1 美国生态学教学情况

美国是世界上公认生态学最发达的国家。在2004年,美国有98所大学设有生态学专业或相关专业方向,有近30所大学设有生态学与进化生物学系,有20多所大学设有与生态学紧密相关的保护生物学方向,有40多所大学设有生态学及环境生物学方向组。在学位授予方面,排名前100名的美国大学中有70多所大学授予生态学方向的博士学位,有63所大学授予生态学硕士学位。美国还拥有世界上规模最大的生态学会——美国生态学会(ESA),会员达10 000多人,成员数量远远超过国际生态学会(The Ecological Vision Committee, 2004)。美国很多大学的生态学教学和人才培养都名列世界前茅,人才培养水平高,特色十分明显。美国生态学专业教育具有的特点是:

理论与应用并重。美国很多大学生态学专业以生态学与进化生物学命名,比较偏重理论研究和基础科学研究人才的培养,其他大部分学校生态学与国家公园和自然保护区管理、农业生态、保护生态、恢复生态、生态毒理、全球变化等应用性较强的学科方向密切联系,还有部分高校设在文理学院、农学院、森林与国家公园、野生生物保护与管理、资源管理等直接面向社会行业需求培养生态学专业人才(Palmer *et al.*, 2005)。

跨学科培养人才。美国很多大学将生态学设置为跨系、跨学科的专业组或方向,通过多学科交叉和融合实现综合性培养生态学人才的目标。如在美国加州大学 DAVIS 校区的生态学方向组将近30个与生态学相关的系科组合起来,培养生态学专业人才,这些人才根据学生兴趣和教师的研究方向,设为生态系统、保护生态、生态毒理、恢复生态、功能生态、农业生态、人类生态等9个组。

十分注重实践性教学和解决实际问题。美国绝大多数生态学专业方向在人才培养中,都安排相等学分让学生进入科研机构及其野外研究站,在驱使和诱导学生认识生态现象、发现生态问

题、解决实际问题中获得锻炼和提高。美国国家自然科学基金会 (NSF) 建立起来的野外长期生态学研究计划网络 (LTER), 都要求接受生态学专业人才培训和实习锻炼的任务, 并设有专门的野外实习基金, 为生态专业和相关专业的学生增强实践培训提供机会。

课程设置繁多, 可选性很强。美国除了一些基础课程设置为必修课以外, 大多数专业课程为选修课, 而且课程名目繁多。据不完全统计, 美国高校开设的与生态学直接相关的课程多达 200 多门, 很多课程即直接触及前沿领域, 如产业生态学、进化生态学、分子生态学、进化生态毒理学等, 也有很多直接面向应用, 如公园和原野管理、湿地生态学、野生动物保护、规划和设计的生态学基础、森林生态系统的管理、流域管理与生态规划等, 更有不少课程就是基于生态教育的, 如人类生态学、社会生态学、生态旅游、生态伦理等。

### 1.1.2 英国生态学专业教育

英国是世界上生态学教育开展最早的国家之一。英国具有浓重的关注自然、向大自然学习的历史氛围, 产生了多位对生态学做出划时代贡献的生态学家, 如提出进化论的达尔文 (Darwin)、提出“生态系统”概念的 Tansley、提出“生态位”理论的 Elton 等。英国拥有很长的“博物学”历史, 往往将生态学融合贯通在生物学或其他自然科学之中 (Sutherland *et al.*, 2006)。虽然没有冠以生态学的名称, 但生态学专业教育水平很高, 具有显著的特色。

注重学生在解决实际问题的同时提高理论创新能力。英国从事生态学教学和研究的机构, 经常以解决问题为突破口, 特别注重通过对生态现象的认识, 提高学生抽象思维、理论研究的能力。如牛津大学、赫尔大学等著名高校, 即使是一个很小的实验或野外观察, 都要求学生提出假设, 设计实验或观察过程, 检验假设以上升到理论思想的高度。

高度重视野外教学和研究基地的建设, 仪器设备先进。英国很多高校都建有野外研究站或定点观测点, 并有固定人员留守和记录, 为配合学生野外实习或研究, 提供相关资料, 使学生能将短暂的工作纳入到长期的研究工作中, 对培养学生的生态素养具有重要的作用。

### 1.1.3 其他国家的生态学专业教育

德国是生态学的发源地, 并且在全社会形成了重视生态学的浓厚风气。德国的绿党以“生态创造工作机会”为口号, 使之成为德国重要的在野党。德国在植物生态学 (地植物学) 方面拥有优良的传统, 并且还是植被生态学、景观生态学、生态毒理学等重要新兴学科的首倡国。德国的生态学专业大多隶属生物学系, 十分重视学生的生物学基础和地学基础, 高度重视学生的实验动手能力和野外观测实习等教学环节。以前, 生态学专业仅限于综合性大学, 近年来很多工科院校十分注重生态学专业和教学内容的设置。

俄罗斯是国际生态学领域有重要影响的国家。苏联解体以前, 生态学的人才培养主要集中在莫斯科大学和圣彼得堡大学; 进入 20 世纪 80 年代以后, 很多综合性大学和工科院校也设立了生态学专业和课程; 进入 90 年代以后, 俄罗斯虽然设有生态学专业的高校有所减少, 但大多数高校都设有生态学系列讲座。俄罗斯十分重视野外工作, 各大学都有稳定的野外实习工作站, 这些工作站与国家自然保护区结合, 有较好的野外观测条件和系统的资料支持。

## 1.2 国内生态学教学情况

新中国成立前, 国内仅有北京大学李继侗教授、复旦大学曲仲湘教授、云南大学朱彦承教授、厦门大学何景教授、江西大学林英教授等, 在个别大学开设生态学或生态学相关课程。新中国成立后, 尤其是全国高校院系的调整, 直到 20 世纪 70 年代, 因国家建设需要实施“以任务带动学科”的方式推动了我国生态学的发展, 特别是围绕自然区划、农业区划、林业区划、天然林区调查、热带橡胶宜林地及农垦区的遴选等, 推动了人才的培养。如北京大学李继侗教授赴内



蒙古大学建立了以草原或荒漠为研究对象的生态学人才培养基地,留美归来的曲仲湘教授赴云南大学建立了以热带、亚热带植被为研究对象的生态学人才培养体系。20世纪50年代后期,从师于法瑞学派创始人 Braun Blanquant 的朱彦承教授回国到云南大学工作,同时生态学中的苏联学派代表人、科学院院士苏卡乔夫来以云南大学为依托在云南建立热带森林定位站,并维持工作近10年。1956—1958年,苏联阿·库加金教授等在东北师范大学举办了“动物生态学研究班”。此时,我国出现了集英美学派、法瑞学派、苏联学派于一体的情势,培养了一批生态学科研究和教学的优秀人才。“文化大革命”期间,生态学受到了很大的冲击,“文化大革命”后即到20世纪70年代后期,这批人才得以迅速成长,成为生态学教学和科研的骨干力量,生态学教育才逐步得到发展,成为规模较大的重要学科。

现在,我国大多数综合性大学和师范院校,都开设了生态学课程,全国有近70所高校设有生态学本科专业。生态学专业有的设在生物科学院系中,有的设在环境和资源科学相关的院系中。全国有60多所高校授予生态学硕士学位,有30多所高校授予生态学博士学位,有北京师范大学、东北师范大学、云南大学、华东师范大学、浙江大学、南京林业大学、东北林业大学、复旦大学、兰州大学9所高校的生态学入选为国家级重点学科,其中5个在南方,4个在北方。生态学专业分布的区域性格局明显,分布基本合理,学科整体优势和特色基本形成(段昌群,2002)。

生态学本科毕业生考取研究生比例较高,就业者主要去向是教学科研部门、环保部门,部分在农林、水利部门。通过用人单位调查了解到,生态学专业本科生毕业后能独立地开展专业性的工作往往需要3年左右的时间,而硕士研究生毕业往往即可适应专业工作,从而很多专业部门对硕士生普遍较为欢迎。从学生就业看,本科毕业生找工作相对较难,而且待遇不高,从而更多地倾向考研究生进行深造。近年来全国高校普遍扩招,生物学和环境科学类专业就业情况比较相近,但生态学专业就业的供需矛盾相对突出些。

从招生情况来看,鉴于生态学专业的特点,大多数学校对本专业的招生采取相对谨慎的态度,普遍招生数量不大,或按院招生进行专业分流时适当控制规模。一般很少超过50人,大多在30~40人之间。

社会的直接需要在一定程度上决定了本科教育的实际地位。与国外相比,国内生态学本科教育普遍存在着这样的问题:各级部门理论上都认为生态学十分重要,但在具体实践环节中重视程度偏低。生态学是一个综合性很强的学科,贯通多个学科领域,如生物学、地球科学,甚至还渗透到其他自然科学和社会科学体系中,在目前我国政府职能部门和产业部门体系中,生态学没有一个直接“对口”的政府职能部门和产业领域,而是与很多的职能部门和产业部门横向穿插。当前的情况仍然是条块分割、对口不畅,消化、吸纳该专业人才的渠道狭小,容量过低。

生态学基本信息、理论和作用未能真正得到社会的广泛了解,也未真正得到决策部门的纵深认同。一方面,生态学是指导可持续发展的核心科学,另一方面生态学的基本知识和理论并没有真正被社会所接纳。很多公文和媒体在文字上渲染了生态环境问题,但在整个社会中并没有形成自觉运用生态学知识的氛围,生态学理论指导社会经济活动的土壤远没有形成。

生态学属于宏观生物学领域,但从世界上整体来看,宏观生物学人才培养一度被削弱。在20世纪50年代之前,高校生命科学教学的基本内容是宏观生物学。50~70年代,世界分子生物学的快速发展取得了辉煌的成就,不仅仅是该领域的科学家更容易做出成果、更有可能获得诺贝尔奖等国际科学大奖,与分子生物学相关的以细胞、基因为主要对象的生物产业也获得了极大的发展,创造出令人瞩目的经济利益。整个生命科学研究及研究领域由宏观转向微观,我国高校的生命科学教学课程的比重也相应地发生了重要变化:由原来的以宏观生物学教学为主转为了以微

观生物学教学为主,“言必称分子”成了高校生命科学教学的一大特点。例如,依据北京大学1959年的教学计划,宏观生物学课程占绝大部分,目前北京大学的宏观生物学的课程只占1959年教学计划学时数的1/3。但是这种教学及人才培养模式也带来了种种问题,对宏观生物学领域教学的忽视让该学科的科研后劲不足,能做实际工作的人多了,对整个学科发展具有自己独特理解的、真正具有生物学思想的人少了。

从20世纪末以来,国外很多生物学研究机构和企业发现,如果不能深入认识生命现象的生态过程和生态学特点,微观层次上无论怎样深入也仅仅只是一个方面,而且影响整个生命科学和技术的健康发展。为此,开始对包括生态学在内的宏观生物学进行重点建设。我国为此也在全国19所高校建设了国家理科基础科学与教学人才培养(生物学)基地,对分类学、生态学等生物学传统学科进行了挽救式的保护和投入。现在,很多学校开始重视生态学及宏观生物学的教学工作。

## 2. 国内外生态学教学安排与课程设置

生态学面临的实际问题及其具体对象具有很强的区域性,同时人才培养往往也是问题导向型和任务驱动型的,从而不同国家和地区及其高校在教学安排上往往也具有很强的区域性。

### 2.1 国外生态学教学安排和课程设置

#### 2.1.1 美国加州大学戴维斯分校

加州大学戴维斯分校(UC Davis)的生态学专业多年排名全美第一。该校的生态学与进化科学专业(EEB)在教学中十分重视理科基础课程,尤其是生物学基础课程,其中的数学、物理学、化学、生物学等基础性课程占一半以上的学分;专业课程分必修课程和选修课程,其中必修课程不多,选修课程十分丰富。在这些课程中,十分重视两类课程,一是野外调查类课程:生物多样性调查、进化与生态学调查,二是各类跨越和综合不同生物层次解决和分析生态问题方面的课程。研究性、实验性、野外实践性课程占据很高比例。

针对生态学方面的课程主要有:生态学导论、种群和数量遗传学、进化论、系统发育及宏观进化、生物数学、群落生态学、脊椎动物结构的系统学分析、动物的交流、种子植物的系统学与进化、海洋生态学、植物生态学、杂草的种群生物学、两栖生物学及野外实习、古植物学、系统生物学原理、生物地理学、生态系统的进化、动物发育的进化、计算遗传学、生物学研究导论、生物学教学等。

#### 2.1.2 美国耶鲁大学

耶鲁大学的生态学与进化科学专业在世界享有崇高声誉。该专业向来以基础广博、专业深厚、内容新颖为特色,尤其强调实证和动手研究。

本专业开设的生态学类课程主要有:普通生态学、人类遗传变异与进化、进化论、生态学与行为学原理实验、生命史、生命多样性、生命科学的统计学、普通生态学、进化生物学、进化生物学实验、流行性疾病的生态学与进化、野外生态学、动物行为学、植物多样性与进化、植物多样性与进化实验、鱼类学、鱼类学实验、鸟类学实验、分子系统生物学实验、保育遗传学、野生动物保育生态学、景观生态学、水生生态学、生物发育的进化、生态学实验研究、生态学及进化生物学高级研修课程、无脊椎动物生物学专题、进化与保护遗传学专题、系统生物学研究设计、生态学与进化科学的数学模型和量化分析、进化系统的动态等。

#### 2.1.3 美国芝加哥大学

芝加哥大学的进化与生态学(EEB)专业名列全美前5名。该校的生态学专业要求学生先修



完科学课程、生物学课程后,再进入到专业课程。专业课程的学习中将课堂理论教学与导师指导下的实践教学有机融合。他们开设的重点课程主要有:

**生态学:**本课程内容为人与自然环境相互作用的一些生态的和进化的基本理论,包括种群增长、适应、生态系统的结构和功能、生物多样性的重要性及其调节机制。

**进化生态学:**对于将在生物学或医学领域择业的学生,本课程为必须完成的学科之一。这门课程着重阐明了生态学和进化生物学的主要理论。其中生态学的主要内容包括:种群统计学、生活史、竞争、捕食和生态群落等;进化生物学的内容包括进化的证据、生命形成过程、进化机制(突变、选择、遗传漂变)、适应、物种的形成、进化的起源、生命的起源和人类的进化。

**生态学在保护生物学中的应用:**这门课程主要是将生态学理论贯穿到当前的生物保护的活动中。课程着重强调数量方法在生态学中的具体运用,例如,自然资源的利用、灭绝的危险性评价、生物量的最大获得、物种入侵的动态以及种间作用的重要性。课程的材料主要来自当前的学术刊物上。本课程内容还包括两个星期的野外考察和计算机模型的实验室设计。

**野外生态学:**本课程是对拟攻读硕士学位的本科生而开设的。针对进化的重要课题,本课程主要对北美洲的动物栖息地、植物产地以及如何组织生态学和行为学方面的野外调查。课程包括在寒暑假内两周的野外调查。调查中有非正式的演讲和讨论、个人和集体的项目研究。每年的下学期初将举行有关调查地点的生态学以及野外调查研究技术和方法的讲座。

#### 2.1.4 美国乔治亚大学

乔治亚大学是美国最早的州立大学之一。该校有国际知名的现代生态学宗师 E. P. Odum。该校生态学专业要求学生具有扎实的理科和数学基础。生态学专业设置了物理、普通化学、有机化学、生物学及微积分课程,作为基础课的学习,要求每位学生在每项课程中必须选两门课。攻读生态学学士学位的学生一般在大学一年级的第一学期就进入这些课程。

生态学专业的课程还有必修课和选修课。首先开的课程为普通生态学和初级研究班课程。在上普通生态学课程之前,必须完成普通化学和普通生物学的课程。学完普通生态学后,接着就要进行两门必修课的学习。这两门必修课程为种群和群落生态学及生态系统和景观生态学。此外高年级的学生还要选修高级研究班课程。

生态学选修课由弗兰克林学院和生态研究所共同确定。课程设置的目的在于扩大学生的知识面和拓展生态学的应用领域。对生态专业的学生,在分类学和博物学中必须选一门,这样才能使他们对植物类群或动物类群有一个认识。在如下的一个课程组合中:遗传学、生物化学、微生物学、统计学、地貌学、生物气候学、历史地理学、海洋生态学,学生需从中任选三门课程。

为使学生在生态学方面达到专业水准,学习不仅仅只是课堂上听课。该研究所提供了许多动手实践的机会。为了更好地进行研究、到野外实习或写毕业论文,学生们可以与教授进行正式联系,所有这些学习内容都与本专业的选修课直接挂钩。生态学专业的学生组建了生态俱乐部,主要组织一些具有一定科技水平的社会实践活动。

本科生态学专业设置的课程:

- 环境问题的生态基础:以生态的观点理解环境问题。本课程的内容包括:人口增长、生物多样性的丧失,资源极限、污染和全球气候的变化。

- 环境与人类:从历史的观点,遵循主宰人与自然界相互作用结果的自然规律和生态进程来研究全球环境问题。

- 初级研讨班课程:生态研讨班课程用于给大一的学生介绍生态学的组织方法,说明本专业的要求,并可根据学生兴趣、就业或继续教育的要求,提供一些可创建个人项目的选择。

- 生态学及实验：种群的结构与动态、群落的结构和分类、生态系统的物质和能量流动为本课程的主要内容；生态实验：让学生获得用于评估有机体、种群、群落和生态系统的相互作用的技能和方法。野外实习根据实习的时间安排，可安排一些额外的校内论坛。

- 应用生态学：通过学习确定人与自然的不协调性及对生态系统结构与功能的影响。通过个案研究，阐明环境毒理生态学、保护生态学、农业生态系统生态学、恢复生态学等领域的工作方法。

- 保护生态学：内容包括生态学在物种多样性保护中的应用，科学家在生态保护中的方法设计和政策制定方面的作用。

- 指导性阅读：在教师的指导下，通过对有独创性论文和评论性文章的阅读与讨论，从而获得生态学某一领域的详实的知识。

- 生态学专题：生理生态学：有机体对环境因子的生理反应；种群和群落生态学：内容主要为生物有机体的出生、死亡和迁移，着重研究种群的动态，植物和动物群落的构成及动力；生态系统生态学：自然和人为生态系统的结构及功能，尤其以从小区域到全球范围的能量循环和生物地球化学循环过程为本课程的主要内容；生物圈的进化：与生命起源和进化相关的基本概念及对新观点的批判性评价，生物多样性及其在生物地化循环和生态系统中的功能。

- 野外系统生态学：通过经验性的调控和系统模型的共同作用研究野外生物和陆地及水生生态系统的动态过程。

- 生态学研究与分析：古生物学：考古动物学、环境考古学；自然标本管理学：自然标本管理的理论、措施，包括高级分类、鉴别、野外收集、评估、准备、补救及数据处理；湖沼学：水生生态系统（湖泊和河流）及其生物的研究，陆地生态系统和水生生态系统的联系；自然史实习：学会在收集人员的指导下，了解对收集材料的管理技术和其他管理程序。

- 生态学调研：在公共机构、非营业性环境组织或与生态相关工业中进行的有学校监督的实习。

- 高级研讨班：对有独创性的报告或生态科技论文进行讨论或批评性的评价，学生也可以对具有时代性的课题进行讨论。

- 项目研究：在教师的指导下，由学生独立完成某一项目的研究。

- 论文写作：在教师的指导下，根据所做的研究写出有较高水平的论文。

### 2.1.5 英国剑桥大学

剑桥大学（University of Cambridge）是世界上最为古老的大学之一，它以深厚的学术研究传统、严谨求实的治学态度以及丰富多彩的教学方式，数百年来一直持世界知名大学之牛耳。政治、法律、历史、文学、语言学、建筑、物理等学科是剑桥大学的传统优势学科，长期以来它在这些领域内的研究一直走在世界的前列。剑桥大学在生物学，特别是在生态学领域的国际知名度或许没有上述学科那么显赫，但是依托于剑桥这样一个良好的研究氛围，其研究也有不少独到之处，而且研究水平也是国际水准的。

该校的生态学作为生物学学士学位的一个专业方向，主要以生态学及环境生物学为重点，强调生态过程的分析、全球环境问题、多学科交叉融合等。进入专业课程学习之前，必须学习基因、细胞、个体、种群等生物层次上的生物学、生态学课程，在此基础上再学习进化与系统生物学成套课程，包括系统生物学、古生物学、适应、自然选择、分子进化、性选择等重要内容。另外定量分析方法也是重要的必修课程，包括观测和实验设计、数据的计算机分析等。选修课程包括全球变化、生态基因组学、生态系统过程分析等处在学科前沿的理论水平十分高深的相关内容。

另外还有很多研究性课程，包括：①植物生理生态学、真菌生态学、气候土壤和植物的相互



关系；②进化生物学、生态学和行为生态学：河口岸、海岸和淡水生态学，受精生殖生态学，微型哺乳动物及寄生生物的种群生态学，昆虫的群体生活及社会行为，鸟类的觅食行为及社会性行为，昆虫的领域行为，生物的生殖策略和性选择模式；③生物地理学：当代热带地区的生物地理，主要涉及资源保护和管理；④环境问题中的生态学：发展中国家的环境决策、农业生态系统，热带非洲及热带太平洋地区的环境和生态系统（硕士、博士学位/研究式），全球或局部地区的环境问题及其控制、资源利用的评估。

2.2 国内生态学教学安排与课程设置情况

我国的生态学专业课程设置有一定的区域性，但差异不像国外那样大。从课程体系来看，设置在生命科学院及生物系中的生态学专业，有关生物学的课程比例较高，设置在环境（资源）科学院（系）中的生态学专业，有关生物学的课程比较低。农林院校的生物学比较偏重一些生物学的应用学科，如农学、林学、病虫害等课程。

各校开设的生态学课程，在专业基础课程上基本相近，主要有普通生态学（或基础生态学、生态学概论）、植物生态学、动物生态学、景观生态学等。主干课程及选修课程有：污染生态学、环境生物学（或环境生态学）、大自然保护、生态工程学、生态经济学、恢复生态学、进化生态学、生态规划、保护生物学等。在农林院校中，还普遍开设了农业生态学、森林生态学、生态农业、水土保持等。生态学专业主干课程和选修课程的设置，与各高校所在区域的特点和优势科研方向密切相关，如北京师范大学的鸟类生态、能量生态、理论生态等；东北师范大学的草地生态、湿地生态等；云南大学的污染生态、植被生态等；华东师范大学的城市生态、植被生态等。

根据国内生态学专业课程的基本情况，可以把课程体系归纳如表1。从表1中可以看出，国内生态学层次性比较强，从基础课程到专业理论课程、应用性课程、交叉性课程等；另外，理论教学分量重，系统性强，便于学生在较短的时间内记忆；主要偏重实际需要设置课程，理性思维方面的课程较少。

与国外相关课程比较来看，我们的课程名称相对比较宽泛，教学深度不够，同时反映学科前沿动态性的教学内容总体上比较欠缺，实验和实践教学环节分量小，而且缺乏系统性。

表1 国内生态学课程体系概览

课程定位与类型		课程体系
基础理论课程	反映基础知识和整体框架的课程	普通生态学/基础生态学/生态学原理
	着重生态过程及其机理的课程	植物生态学 动物生态学 景观生态学
应用基础性课程		应用生态学，污染生态学，生态毒理学 大自然保护/保护生物学
技能和技术性的课程		3S 技术及应用，生态监测与评价 恢复生态学，生态工程学
生态专业知识进入社会决策途径的课程		生态经济学，生态规划
其他专业课程		农业生态学，森林生态学，人类生态学，城市生态学，化学生态学，行为生态学，全球变化生态学

### 3. 国内外生态学教材及其编写比较分析

全球范围内以英语为教学语言的国家和地区,生态学教材的共享程度、国际化程度很高。长期以来,欧美发达国家,尤其是美国和英国在生态学研究 and 人才培养方面走在世界前列,国际上知名高校和研究机构的教授和科研人员大多也在这些国家接受教育,从而承袭英美等英语国家生态学教学组织、课程结构、教材选用模式。即使是非英语作为教学语言的国家和地区,在积极向发达国家学习生态学科学研究和人才培养的同时,也基本上沿用了他们的教材。因此,国内外教材的比较在本质上就是英语教材与国内汉语教材之间的比较。

#### 3.1 英语生态学主流教材及教学重要参考书

1) Manuel C. Molles (美国新墨西哥大学教授) 编著, *Ecology: Concepts and Applications* (2006 第四版), 英文软包装 608 页。由 McGraw-Hill Science/Engineering 出版。2000 年中国科学院研究生院将该教材列为研究生教学丛书并由科学出版社出版影印本; 该书英文第二版由高等教育出版社在 2002 年出版影印本; 第四版的影印版于 2007 年 9 月份已在高等教育出版社出版发行。

2) Robert E. Ricklefs. *The Economy of Nature*. 5th Edition W. H. Frennman & Company, 2001. 2004 年 7 月由高等教育出版社组织翻译出版影印本。

3) Krebs C J. *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 5th Edition. New York: Harper & Row, 2001. 2003 年由科学出版社在中国出版影印本。

4) Monroe W. Strickberger. *Evolutionary Biology*. 3rd Edition. Jones and Bartlett Publishers. 2002 年由科学出版社在中国出版影印本。

5) Begon M, Haper J L and Townsend C R. *Ecology-Individuals Populations and Communities*, 3rd Edition. 1996. Oxford: Blackwell Sciences.

6) Briggs D and Walters S M. *Plant Variation and Evolution*, 3rd Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

7) Chapman S B. *Method in Plant Ecology*. Oxford: Blackwell Sciences, 1976.

8) Cox G W and Atkins M D. *Agricultural Ecology*. San Francisco: W. H. Freeman, 1979.

9) Cox C P. and Moore P D. 5th Edition. *Biogeography-An Ecological and Evolutionary Approach*. Oxford: Blackwell Sciences, 1993.

10) Crawley M J. *Plant Ecology*. Oxford: Blackwell, 1986.

11) Dodson S I. *Ecology*. Oxford University Press, 1998.

12) Forman R T T and Shmida A. *Landscape Ecology*. New York: John Wiley, 1986.

13) Foy C D. *Origins and Development of Adaptation*. Pitman Publishing Ltd. 1984.

14) Futuyma D J. *Evolutionary Biology*. 3rd Edition. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.

15) Futuyma D J. *Science on Trial: The Cause for Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates, 1995.

16) Gotelli N J. *A Primer of Ecology*. 2nd Edition, Sundeland: Sinauer Association. 1998.

17) Grime J P. *Plant Strategies and Vegetation Processes*. Chichester: Wiley, 1979.

18) Harborne J B. *Introduction to Ecological Biochemistry*. New York: Academic Press, 1977.

19) Harper J L. *The Population Biology of Plants*. London: Academic Press, 1977.



- 20) Hutchinson G E. The Ecological Theater and the Evolutionary Play. Newhaven: Yale University Press, 1965.
- 21) Kormondy E J. Concepts of Ecology. 4th Edition. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1996.
- 22) Krebs C J. Ecology, 4th Edition. New York: Harper Collins. 1994.
- 23) Larcher W. Physiological Plant Ecology, 5th Edition. Berlin: Springer, 1997.
- 24) Merrell D J. Ecological Genetics. London: Longman, 1981. (黄瑞复等译. 生态遗传学. 北京: 科学出版社, 1991.)
- 25) Newman M C. and Jagoe C H. Ecotoxicology-A Hierarchical Treatment. New York: Lewis, 1997.
- 26) Niklas K J. The Evolution Biology of Plants. Chicago: The University of Chicago Press, 1997.
- 27) Odum E P. Fundamentals of Ecology, 5th Edition. Philadelphia: Saunders, 1989.
- 28) Pianka E R. , Evolutionary Ecology, 3rd Edition. New York: Harper and Row, 1997.
- 29) Pollard J W. Evolutionary Theory: Paths into the Future. Chichester: Wiley, 1984.
- 30) Rice E R. Allelopathy. New York: Academic Press, 1974.
- 31) Ricklefs R E. Ecology. 4th Edition, W. H. Freeman & Company, 1999.
- 32) Rose M R and Lauder G V. Adaptation. San Diego: Academic Press, 1996.
- 33) Schierwater B, Streit B and Wagner G P. Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Basel and Boston: Birkhauser Verlag, 1994.
- 34) Smith R L. Ecology and Field Biology, 3rd Edition. New York: Harper, 1980.
- 35) Smith R L. Elements of Ecology. 4th Edition, Addison-Wesley ( Benjamin/Cummings ), 1998.
- 36) Sorbrig O T and Solbrig D C. An Introduction to Population Biology and Evolution. Addison-Wesley, 1979. Reading.
- 37) Stiling Peter. Ecology: Theories and Applications, 3rd Edition. Prentice Hall, 1998.
- 38) Tilman D. Plant Strategies and the Dynamics and Structure of Plant Communities. Princeton: Princeton University Press, 1988.
- 39) Townsen C R and Calow P. Physiological Ecology: An Evolutionary Approach to Resource Use. Oxford: Blackwell Sciences, 1981.
- 40) Wallace Arthur,. Mechanisms of Morphological Evolution: A Combined Genetic, Developmental and Ecological Approach. Chichester: John Wiley & Sons, 1984.
- 41) Walter H. Vegetation of the Earth. Berlin: Springer, 1979.
- 42) Wilson E O. The Diversity of Life. Cambridge: Harvard University Press, 1992.

### 3.2 国内的生态学教材建设与发展

在 20 世纪 80 年代, 我国的生态学教材比较少而且也很单一, 主要使用曲仲湘等编写的《植物生态学》(人民教育出版社 (第一版), 1980; 高等教育出版社 (第二版), 1983)、孙儒泳编写的《动物生态学原理》(北京师范大学出版社, 1987), 另外还有祝廷成等编写的《植物生态学》(高等教育出版社, 1988)。

进入 90 年代以后, 一批生态学教材出版面世, 使用较多、影响较大的教材主要有, 尚玉昌等编写的《普通生态学》(高等教育出版社, 1992 (上), 1995 (下)), 孙儒泳、李博等编写的

《普通生态学》(高等教育出版社, 1993), 郑师章等编写的《普通生态学——原理、方法与应用》(复旦大学出版社, 1994), 另外还有专业课程教材如王焕校编写的《污染生态学》(云南大学出版社, 1990), 徐汝梅编写的《昆虫种群生态学》(北京师范大学出版社, 1987)等。

进入新世纪以后, 各种层次的生态学教材不断涌现, 如李博等主编的《生态学》(高等教育出版社, 2000), 李振基等编写的《生态学》(科学出版社, 2000), 宋永昌编的《植被生态学》(华东师范大学出版社, 2001), 常杰等编写的《生态学》(浙江大学出版社, 2001), 王焕校主编的《污染生态学》(高等教育出版社, (第二版), 2001), 盛连喜主编的《环境生态学概论》(高等教育出版社, 2002)、曹凑贵编写的《生态学概论》(高等教育出版社, 2002, 面向农业院校), 戈峰主编的《现代生态学》(科学出版社, 2002, 科学院系统研究生用书), 姜汉侨等编写的《植物生态学》(高等教育出版社, 2004)等。还出现了一批生态学教材参考用书, 如《生态系统生态学》(蔡晓明, 科学出版社, 2000)、《理论生态学》(张大勇, 高等教育出版社, 2000)、《生态工程学》(钦佩等, 南京大学出版社, 1998)、《全球生态学——气候变化与生态响应》(方精云等, 高等教育出版社, 2000)等。与此同时, 国外一批优秀生态学教材被引入国内, 高等教育出版社和科学出版社相继影印出版了多本具有重要国际影响的教材。

2000年以来, 有关生态学的教学参考丛书也相继问世, 如高等教育出版社出版的系列评述丛书《植物科学进展》(李承森主编)、《现代生态学讲座》(邬建国、葛剑平等主编)、《生态科学进展》(段昌群主编)。另外还有一些教学研究报告, 如《生态学教学理论探索与实践——21世纪大学生态学教学内容优化及课程体系建设》(段昌群主编, 高等教育出版社, 2001)、《环境科学类专业教学改革研究报告》(教育部高教司等, 高等教育出版社, 2003)。

目前, 国内基础生态学教学使用较为普遍的国内外教材主要有(以拼音为序):

- 1) Barbour M G, Burk J H, Pitts W D, Gilliam F S and Schwartz M W. 1999. *Terrestrial Plant Ecology*. Addison Wesley Longman Inc.
- 2) Charles J. Krebs. 2002. *Ecology* (影印版). 北京: 科学出版社.
- 3) Manuel C. Molles. *Ecology: Concepts and Applications*. 科学出版社 2000 年出版了其影印本, 第四版影印版 2007 年由高等教育出版社出版.
- 4) Mackenzie 等著. 2000. *生态学* (中译本, 第二版). 孙儒泳等译. 北京: 科学出版社.
- 5) Robert Ricklefs 著. 2004. *生态学* (第五版, 中译本). 孙儒泳等译. 北京: 高等教育出版社.
- 6) Walter Larcher. 1997. *植物生理生态学*. 翟志席, 郭玉海等译. 北京: 中国农业大学出版社.
- 7) 蔡晓明. 2000. *生态系统生态学*. 北京: 科学出版社.
- 8) 曹凑贵主编. 2002. *生态学概论*. 北京: 高等教育出版社.
- 9) 方精云主编. 2000. *全球生态学——气候变化与生态响应*. 北京: 高等教育出版社和 Springer 出版社.
- 10) 戈峰. 2002. *现代生态学*. 北京: 高等教育出版社.
- 11) 姜汉侨, 段昌群, 杨树华, 苏文华, 王崇云. 2004. *植物生态学*. 北京: 高等教育出版社.
- 12) 蒋高明等. 2004. *植物生理生态学*. 北京: 高等教育出版社.
- 13) 李博主编. 1999. *生态学*. 北京: 高等教育出版社.
- 14) 宋永昌. 2002. *植被生态学*. 上海: 华东师范大学出版社.



15) 孙儒泳, 李博, 诸葛阳, 尚玉昌编. 普通生态学. 高等教育出版社, 1992.

16) 孙儒泳编. 2002. 动物生态学原理. 北京: 北京师范大学出版社.

17) 孙儒泳, 李庆芬, 牛翠娟, 娄安如. 2002. 基础生态学. 北京: 高等教育出版社.

18) 孙儒泳, 尚玉昌、李庆芬. 2004. 生态学 (第五版) (The Economy of Nature, 2001). 党承林主译. 北京: 高等教育出版社.

19) 王焕校等. 2000. 污染生态学. 北京: 高等教育出版社.

20) 祝廷成, 钟章成, 李建东. 1988. 植物生态学. 北京: 高等教育出版社.

### 3.3 国外教材的特点与国内教材的主要差距

#### 3.3.1 国外教材的主要特点

(1) 教材种类多, 内容组织多样化、个性化。国外很少有统一的教材, 也没有硬性规定的教材, 不同层次的学校针对不同的授课对象完全自主地选择教材, 这些教材中在基础生态学领域主要选用国际上通用的知名教材, 并结合本校和本地的情况, 在教学中进行增减, 以体现自己的教学特色。

(2) 理论水平高, 系统性强。国外教材的编著者在教材编写过程中, 都按照一定的生态理念来资助组织安排教学内容, 有的从解决环境问题的角度来统筹生态学内容, 有的按认识地球生态系统过程的方式来组织内容, 有的按照重要生态学理论来构建内容体系, 主要是通过学习能给学生一个全面、系统的知识框架, 并建立不同生态层次及其知识单元间蕴含的内在联系, 以形成生态学知识的系统性。

(3) 前沿性和实证性。国外教材能够将生态学领域的最新研究进展很快地渗透到教材中, 往往作为重要的案例进行剖析, 提高了知识的更新程度, 同时十分注重将研究生态学问题的视野、思路、方法融合到教材的编写过程中, 让学生体会到知识的创新和发现机制, 从而提高学生的创新能力。

(4) 内容丰富, 体量很大。在国外, 大学教材的定位只是教师授课和学生学习的一个重要参考, 不是所有的教学内容。在教学过程中, 教授们往往并不按照教材设定的内容一点一点地讲授, 更多地是提醒学生在自学和研修中应该注意什么问题, 并且在教材以外补充大量的研究案例。因此, 教材往往很厚, 信息量很大。对知识的提炼主要需要学生自己完成, 或在讲授的指导下以学生为主自主完成。任何一本教材都给教师上课和学生自学留下了自由发挥的空间, 不会面面俱到, 更不会对什么内容都全盘脱出。同时任何一本教材涉及面都很广, 可以适应很多的教学单位, 各教学单位可以根据自己的教学需要合理选择, 所以基础生态学的教材往往并不多, 但专业及专业方向层次上的教材或教学参考书极其丰富。

#### 3.3.2 国内教材的主要差距

我国的生态学教材具有鲜明的特点, 这就是围绕解决实际问题的直接需要来解析生态学理论, 实现了理论和实践的有机结合, 同时很注重概念、原理、应用这样一个体系的建立, 使学生的学习、教师的教授比较轻松, 相互之间的一致程度高。这些优点, 使教学工作便于组织, 教材编写便于被认同。但是, 如与国外优秀教材相比, 我们的教材在如何培养创新性人才、构建创新文化, 满足创新国家的需要方面, 有很大差距。

(1) 教材内容扁平化, 教材编写趋同化。2005年前生态学教材总体很少, 此后教材编写和出版十分繁荣, 但是由于缺乏对教材编写的深入研究和人才培养的深入思考, 相当多的教材与现代生态学发展不相适应。已经出版的教材, 存在“专业不专, 普通不普”, 呈现“扁平化”的态势, 同时教材缺乏应有的层次。已出版的几种教材, 在格式与内容方面相近。目前多数院校分别

开设植物生态、动物生态和微生物生态学，在教学内容上重复较多，内容组织大同小异。根据现在专业设置和课程体系改革要求，编写多层次的普通生态学教材势在必行。

(2) 教材编写的知识体系配置简单化模仿。在教材编写中，生态学知识体系的组织有两种形式，一是长期以来我国几乎所有大学都沿用的“由小及大”的方法，即个体→种群→群落→生态系统由点及面的展开。二是国外近年来很多大学采用的“俯视—透视”的方法，即生态系统和群落→种群→个体及生态因子，先从宏观整体上把握，再在具体位点上进行分析。虽然两种教学方式都有特色，但在生态学这个学科领域，后者在指导学生认识问题上具有更大的启发性，符合生态学特殊的认知过程。在生态学中，如果宏观整体上没有得到较好的把握，微观上精细研究也失去了意义。而目前，国内的生态学教材大多数还是沿用国外 20 世纪 80 年代以前的知识体系组织方法，在教学中对近 20 多年来生态学领域在进化、适应等重要生态学现象、机理、过程等的介绍十分欠缺，影响了我国生态学教学质量和水平的提升。本教材全书的主要框架按照后者形式进行组织，为了便于与传统方式有较好的过渡，每一章节内部适当参考传统方式，以充分发挥两种教学内容安排的优越性。

(3) 教材编写的新颖性、前沿性不足。将学科前沿领域和热点问题有机地贯穿在教材中，是大学教学水平的创新基础。强调新内容的补充和强化，任何一本教材，在介绍基本概念、基本理论以及解决实际问题的切入点的同时，应该把本学科一些前沿领域和热点问题贯穿相关内容中，才能启发学生的创新意识。近 10 年来，生态学在全球变化、转基因植物的释放和生物安全、植物的适应对策、受损环境的植物修复等方面取得了显著进展，而且人类面临的生态环境形势也日趋严峻，这些问题的机理、过程在现行的不少教材中反映较少，即使有也是简单化处理，对其深层次的生态原理的分析更是寥寥无几。

## 4. 教材建设的建议

长期以来，我们对教材编写的争议往往是厚了好，还是薄了好，主要停留在教材的厚薄上，而对教学内容的提炼分析和整合不足。近年来随着高等教育的大众化，“宽口径、厚基础”的要求使得四年的大学本科教育阶段内，在专业层面上的教学往往时间更加有限。为此，在有限教学资源的条件下，如何提高培养对象的专业性，避免生态学专业人才和其他专业无差异，千人一面，就需要在教材建设和出版中认真分析，深入研究生态学及其相关专业涉及的生态学的核心内容，探讨这些内容优化配置的课程体系，围绕课程教学构建教材编写和出版的整体方案。

### 4.1 生态学核心教学内容分析

生态学同生物学的其他学科明显的不同在于，它强烈要求微观上“点”的深入和宏观上“面”的背景的紧密结合，否则就失去了生态学的要义。这就是说，它的研究需要对整个学科的宏观背景有较深的了解后，才能把握每个具体研究领域中的核心问题，同时每个具体领域中的问题也只有放到整个生态学的宏观背景中，才能找到它的地位和实现研究的价值。

生态学专业教学中需要特别注意两点：一是生态学的综合性。生态学的优势在于它能综合地分析和判断问题，不仅看到问题的现在，也预见它的将来；不仅看到局部，也看到整体；不仅看到问题本身，还看到它与其他问题的联系。生态学的综合视角可以防止片面地、孤立地、机械地看问题，为国家避免损失，为人类减少灾害。二是生态学的宏观性。生态学从微观到宏观都在发展，都很重要，但宏观性研究更为重要。生态学的宏观性并不完全在于研究对象及其范围很大，而是研究任何层次的生态问题，都要把它放在一个更大的宏观背景上来认识和分析。宏观着眼、



微观着手是生态学研究的基本方略。

正因为如此,生态学的教学内容的设计也必须在整体学科体系上来考虑,首先应该强调各课程是生态学整体学科构架中的一个有机组成部分,借此确立它在整个生态学教学中承担的角色以及在人才培养中应该解决的问题。其次是该课程自身作为一个功能单元的相对独立性。简单地把生态学专业的教学理解为由若干个不同名称的课程系列是不妥的,更应该强调不同名称的课程教学中具体的知识内容。

生态学研究内容极其庞杂,其自身的层次很多,每一个层次研究的纵深程度差异很大,且不可比,同时生态学应用领域也十分宽广,这样就给从整个课程体系的角度来遴选和优化教学内容带来了很大的难度。为了解决这一问题,我们首先从本科生态学人才培养目标对教学内容和范围的要求出发,根据我国现行大学课程整体安排情况对专业课程可支配教学资源的程度,打破课程界限,从整个生态学领域中遴选核心教学思想,然后再根据这些内容来探讨通过怎样的课程体系来完成。

根据生态学的内涵和经济社会发展对本学科提出的任务和需求,生态学教学核心内容应该涵盖如下方面:

(1) 生态学是研究生物与环境关系的一个知识体系。在生态学中,内在的生物因素和外在的环境因素都是同等重要的。生态学的学科要义是以“关系”为核心展开的,这个关系包括三个方面:环境对生物的选择作用和塑造,生物对环境的适应,适应环境的生物对环境的改造。外在环境因素具有很大的时间和空间变异性。生物因素包括生物的形态与组织结构、生化过程与生理代谢、发育与形体建成、遗传与群体的基因传递等,这些生物因素都受对应时间和空间尺度的环境因素的影响。在生物与环境的关系中,生物适应与环境选择、环境对生物的塑造作用与生物对环境的改造作用是一个过程的两个方面。

(2) 选择适应和协同进化是生态学的核心问题。适应存在于任何层次的生命系统(从分子到生态系统)与其相应的环境之间,适应也是生物内在因素相互协同发展的过程。适应是整体性的,自然选择是适应发生的内在机制。整个生态学只有从进化的角度才能进行理解和诠释。生物圈的形成发展史,是生物适应环境的历史记录,也是生物改造地球环境的历史过程,还是生物与环境协同进化的历史(段昌群等,2006)。

(3) 生态学具有层次性,在个体、种群、群落及生态系统等不同层次上的生态现象和生态规律不是通用的。生态过程及其发生在不同的时间和空间尺度上具有差异性。生态过程的发生也具有偶然性,机会在生态现象的产生中具有一定的影响(陈吉泉等,2006)。

(4) 对生物与环境之间的关系规律和原则的掌握,是认识生物群体的更新规律的基础,也是合理利用生物资源的基础。

(5) 生态系统是自然界行使作用、发挥功能的单位。生态系统成分的完整性、各成分之间的协同作用及其方式的多样化是生态系统结构优化的基本要求,良好的生态结构是生态系统功能获得发挥的条件保障。只有生态系统的功能是完善的,生态系统才能为人类最大限度地提供物质保障和环境保障。

(6) 人类对生物资源的不合理利用和对环境的破坏,就构成了生态破坏;人类向生态系统引入过多的外源物质,就导致了环境污染。生态破坏和环境污染都将导致生态系统结构的退化和功能丧失,最终影响人类自身的可持续发展。认识人与生态系统及生物圈的协同关系,是寻找可持续发展道路的理论基础。

(7) 人类经济活动对自然界提供的环境支持和物质保障有着绝对的依赖,在当今世界上自

自然界提供这些保障的程度有赖于人类对生态系统及其生态过程的理解程度和基于该知识基础上的保育程度。生态学知识和理论可以从上述的效用层次上或生态—经济—社会复合系统（生态经济系统）中寻找影响社会，指导决策的切入点。

4.2 生态学课程体系

根据生态学核心教学内容，生态学课程体系应对生态学基础理论系统性和综合性进行整体把握，其中包括专业基础知识，应用生态学的技术、研究手段以及指导和引领经济社会协调发展的生态学方法，树立生态观，形成良好的生态学素养。

生态学还是一门实验科学、实践教学，具有极其重要的地位和作用，为此，课程体系应包含专业实践训练：基础性实验、综合性实验、野外实习、社会调查、创新实验、毕业设计和毕业论文。

据此可以归纳出生态学的课程体系。生态学的课程体系见表2。

表2 生态学课程体系

课程目标模块	课程组合
基础生态学	普通生态学 <sup>*</sup> /生态学原理 <sup>*</sup> 、进化生态学 <sup>*</sup> /进化生物学 <sup>*</sup> 、景观生态学 <sup>*</sup> 、分子生态学、生理生态学、种群生态学、行为生态学、群落生态学、生态系统生态学、生态遗传学、数学生态学、化学生态学等
应用生态学	自然资源生态学 <sup>*</sup> 、污染生态学 <sup>*</sup> /生态毒理学 <sup>*</sup> 、城市生态学 <sup>*</sup> 、保育生物学/保育生态学、森林（农业、草原、湿地、海洋、湖泊、流域等）生态学、生态模拟与仿真、生态规划、养殖生态学、旅游生态学、环境生态学、灾害生态学、生态经济学 <sup>*</sup> /产业生态学 <sup>*</sup> 等
生态工程和技术	恢复生态学 <sup>*</sup> /生态工程学 <sup>*</sup> 、3S技术及其应用 <sup>*</sup> /生态监测与评价 <sup>*</sup> 、环境仪器分析、系统动力学、环境数据处理与数学模型、遥感与环境制图、数据库与信息技术、污染防治技术、清洁生产导论等
生态科学与社会	生态伦理学、人类生态学、生态安全、环境法学、全球变化生态学、环境评价、环境管理学、环境政策分析、生态学进展等
实验及实践环节	生态学实验、生态学野外实习、生态学数据处理和统计分析方法、生态学专业外语、生态学创新实验、生态学科研训练及毕业论文指导

★：属于核心课程。

4.3 生态学系列教材建设方案及编写建议

4.3.1 系列教材建设方案

根据生态学课程体系的构建，可以按不同教学阶段编写不同层次的教材。为此提出生态学系列教材的编写书目。

I. 大学生态学基础教材建议书目

- 普通生态学
- 植物生态学
- 动物生态学

II. 大学生态学专业教材建议书目

(1) 按生物生态层次

- 分子生态学
- 生理生态学
- 植物/动物种群生态学



- 植被/群落生态学
- 生态系统生态学
- 景观生态学
- 全球生态学

## (2) 按学科交叉和应用学科

- 进化生态学
- 生态遗传学
- 生态经济学
- 化学生态学
- 污染生态学
- 生态毒理学
- 资源生态学
- 环境生物学/生态学
- 恢复生态学
- 生态工程学

## Ⅲ. 按应用领域

- 人类生态学
- 城市生态学
- 湿地生态学
- 火生态学
- 山地生态学
- 保护生态学
- 流域生态学
- 森林生态学
- 草地生态学
- 荒漠生态学
- 海洋生态学
- 湖泊生态学
- 农业生态学
- 生态农业
- 产业生态学

### 4.3.2 建议近期重点编写的教材

上述系列教材中,有的已经编写出版,并且质量较高,基本满足当前的需要,有的则有出版的教材或专著,或尚无教材也无教学参考书目,不能满足当前的需要,为此需要组织编写。根据国内教材编写和出版的状况,建议对下列急需的教材编写和出版放到优先地位予以高度重视,组织编写高质量的精品教材。

- 普通生态学/基础生态学/生态学导论/生态学原理与方法
- 恢复生态学/生态工程
- 分子生态学/生态遗传学
- 保护生态学/保育生态学

- 景观生态学/全球变化生态学
- 化学生态学/信息生态学
- 城市生态学/草地生态学/资源生态学
- 生态毒理学/污染生态学
- 进化生态学/进化生物学/行为生态学/古生态学
- 湖泊生态学/流域生态学
- 生态经济学/工业生态学与循环经济
- 生态规划/生态监测
- 生态学实验研究方法/生态野外调查与观测方法
- 生态学的数据分析与实验设计
- 生态学与环境生物学专业外语/生态学专业外语

#### 4.3.3 生态学教材编写应该注意的几个问题

(1) 生态学教材编写应从数量增长向质量提升方向转变。近年来资源环境问题成为全社会关注的焦点，与这些问题相关的重要学科一跃成为众多学科的新宠。各种各样的生态学分支学科、交叉学科源源不断地提出，同时各种各样的书目以著作或教材的面目涌入书店，似乎各种教材一应俱全。据不完全统计，近3年来各类生态学教材或教学参考书每年以近百种的速度印刷出版。但事实上，除了部分著作和教材是花了很大心血编写出来的，相当多的教材是速成的，虽然在短时间内可能弥补了相关领域教材和教学参考资料的短缺，略胜于无，但与国际上高水平的教材相比还有很大距离，甚至除了名词翻新外，相当多的质量欠佳。

(2) 动员全社会的专业力量重视生态学的教材建设。生态学是对整个生命科学的学科的宏观把握，是该学科的基础，如果忽视生态学的教学和科研，整个学科的发展就有可能缺乏导向。但是，在过去的20年里，我们过于注重微观生物学领域的教学和研究，视野反而变得狭窄了。2007年教育部生物科学与技术教学指导委员会副主任、复旦大学教授乔守怡先生改动了一句诗词来表达自己对包括生态学在内的宏观生物学的看法：“‘不识庐山真面目，只缘身在“分子”中’，没有宏观生物学的指导，都不知道自己在做什么工作。”重微观、轻宏观的人才培养模式带来了种种问题，对宏观生物学领域教学的忽视让该学科的科研后劲不足，能做实际工作的人多了，对整个学科发展具有自己独特理解的、真正具有生物学思想的人少了。“以前我们过于关注生命科学的微观领域，现在要把视线拉出来了”。目前，主流学科对生态学学科重要性的认识不断上升，这将为生态学教学和教材的编写营造了较好的氛围。

但是，高质量的教材编写是一件原创性的工作，需要具有丰富科研的教学阅历、掌握生态学前沿动态、知识面广、学术水平高的高校教师或科研人员倾力开展的创造性工作。目前，我国最具优势的生态学科科研资源主要集中在科学院系统内，而由于目标不同，科学院对于教材的编写大多重视不够，这样优秀的科研人员及其开展的高水平的科研成果、创新的科研思路就没有充分地反映到服务人才培养的教材编写上，这不能不说是一种损失。同时，高等学校内部目前的利益导向也难以将最优秀的教授吸引到教学研究和教材编写中。我国的出版机构目前还没有发展到积极主动地投入大量资源，组织优质教学资源进行高水平教材编写的能力和水平。至于教材编写，都觉得重要，但往往落在空中。

应该一提的是，我国大学生态学专业教育处于十分尴尬的境地。生态学本来作为生物学的分支学科，但在国家专业目录中被划入环境科学类。这样，生态学教学在生物学领域中被边缘化，在环境科学领域中又常常处于弱势。学科定位混乱，影响生态学的教材建设。



(3) 把实验、实践性的教材编写放到优先位置。长期以来,由于教学资源少和对生态学科认识不到位等原因,对生态学实验、实践性教学重视不够,而随着对素质教育和能力教育的高度重视,实践性教学环节必将得到重视和提高。但是,目前“理论课教材层出不穷,实验性教材寥若晨星”。为此,应把实验、实践性教材的编写放到优先地位。今后一段时间内,应该在生态学实验、生态学野外实习、生态学数据处理和统计分析方法、生态学专业外语、生态学创新实验、生态学科科研训练及毕业论文指导等方面组织编写一批新教材,以尽快填补相关空白。

(4) 积极推进多种层次教材建设,提高教材的国际化水平。目前我们的生态学教材只是简单地模仿和引进国外教材,具有自主知识和理论体系、反映中国人自己生态学理念和学术贡献的教材几乎没有。这对于一个生态环境问题十分突出,未来需要更多的生态学工作者解决我们生态环境问题的国家而言,这种状况无疑和它的急迫需求是极不相称的:

- 中国的社会运作和管理客观需要尽快走向,而且未来也必然是基于对自然的深刻理解的一种管理,因此中国未来的社会管理是基于生态学理论和思想指导下的社会管理;

- 中国科学和技术的发展客观需要尽快走向,而且未来也必然是一种人与自然界和谐友好的科学体系及技术体系,生态学在这个科学体系的形成和建设无疑起到了引领的作用;

- 中国的社会现实,生态学(人与自然界)未来将像数学、语文、外语一样成为任何一个普通公民都应该认识和掌握的基本知识。当这个时代脚步声更加急促临近时,我们的人才培养,尤其是高等教育的人才培养体系和教材建设应尽快做好这个准备。

不仅如此,生态文明作为中华文明对世界文明的新贡献,需要生态学来丰富和提升。生态学又是自然界的经济学,中国传统文化的主要重要内涵与生态学有着天然的一致性,通过生态学发扬光大中华文化,并在此基础上构建面向未来的生态科学和技术体系,是中国对世界文化、科学技术的新贡献。按此进行教材建设,也是中国生态学走向世界的重要突破口。

## 参考文献

陈吉泉,等.生态学家面临的挑战.北京:高等教育出版社.2006.

段昌群主编.生态学教学理论探索与实践——21世纪生态学本科教学内容优化与课程体系建设.北京:高等教育出版社.2001.

段昌群,等.生态约束与生态支撑.北京:科学出版社.2006.

李文华,王如松主编.生态安全与生态建设.北京:气象出版社.2005.

美国总统科学技术办公室.改变21世纪的科学与技术——致国会的报告.高亮华等译.北京:科学技术文献出版社.1999.

GRAHAM M H, et al. Paradigms in ecology: past, present, and future. *Ecology*, 2002, 83 (6): 1479-1480

NSF Advisory Committee for Environmental Research and Education. Complex Environmental Systems-Synthesis for Earth, Life, and Society in the 21 st Century: A 10-year outlook for the Nation Science Foundation. National Science Foundation (USA), 2003.

PALMER M A, et al. Ecological science and sustainability for the 21st century. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2005, 3 (1): 4-11.

SUTHERLAND, W J, et al. The identification of 100 ecological questions of high policy relevance in the UK. *Journal of Applied Ecology*, 2006, 43: 617-627.

The Ecological Vision Committee. Ecological Science and Sustainability for a Crowded Planet—21st Century Vision and Action Plan for the Ecological Society of America. <http://www.esa.org/ecovisions>. 2004.

## 郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

反盗版举报传真：(010) 82086060

E - mail: dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮编：100120

购书请拨打电话：(010) 58581118



中科院植物所图书馆




S0056468

收到期	2010-7
来源	赠阅
书价	
单据号	
开票日期	

檢  
19





An underwater photograph of a coral reef. The scene is dominated by a large, textured coral structure in the foreground, with many small fish swimming around it. The water is clear and blue. The background shows more coral and fish, creating a sense of depth.

# *Advances in Ecological Sciences* (Vol. 4)

ISBN 978-7-04-024842-5



9 787040 248425 >

定价 25.00 元